

OSCAR ROMERO ORMAZABAL



CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



INSTITUTO DE CATÁLISIS Y PETROLEOQUÍMICA

MODIFICACION QUIMICA DIRIGIDA DE LIPASAS EN FASE SOLIDA

Memoria presentada para optar al grado de Doctor por la
Universidad Autónoma de Madrid

DIRECTORES

JOSÉ MANUEL GUISÁN SEIJAS

JOSÉ MIGUEL PALOMO CARMONA

Instituto de Catálisis y Petroleoquímica

C.S.I.C, Madrid



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID

Facultad de Ciencias

Departamento de Química Analítica y Análisis Instrumental

Madrid, 2014

A mi familia

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer la oportunidad, la confianza y el apoyo que me han brindado mis directores, Profesor José Manuel Guisan y Dr. José Miguel Palomo.

Al Profesor Felix Pariente, tutor de esta Tesis Doctoral, y al Profesor Jesús Rodríguez Procopío, coordinador general del programa de Doctorado por su ayuda y disponibilidad en todo momento.

A CONICYT y al Programa Bicentenario Becas-Chile por apoyo financiero para realizar esta Tesis Doctoral.

Al profesor Joaquín Pérez Pariente, director del Instituto de Catálisis y Petroleoquímica del CSIC, por todas la facilidades prestadas durante el desarrollo de esta Tesis, así como a todo el personal del Centro.

A todos quienes han cooperado en los diferentes proyectos en cual se enmarca esta Tesis Doctoral, en especial a la Dra. Blanca de las Rivas del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN). Al Dr. Cesar Carrasco y Profesor Juan Hermoso del Departamento de Cristalografía y Biología Estructural del Instituto de Química-Física Rocasolano, CSIC. Al Dr. Marco Filice y al Dr. Fernando López-Gallego del Instituto de Catálisis y Petroleoquímica.

Un cariñoso agradecimiento a mis compañeros y amigos del laboratorio, Marco, Mateo, Marzia, Javi, Rocío, Sonia, Cesar, Juanma, por su amistad y los buenos momentos compartidos. A todos que han pasado por el laboratorio, ya sea por una corta o larga estancia ha sido un placer conocerlos en especial a Caio, Willian, Claudia, Paulina, Jana, Antonio, Tanja, Andrés, Andrea, Feng.

Quisiera agradecer profundamente a todos que durante estos casi cuatro años me han ayudado, enseñado, aconsejado, guiado para llevar a cabo esta Tesis Doctoral, en especial a Marco y José Miguel.

Un agradecimiento muy especial a Lorena Wilson y Andrés Illanés, quienes gracias a sus oportunidades, apoyo y confianza me iniciaron en este mundo de la investigación. También quiero hacer extensivo este agradecimiento a todos mis amigos y compañeros del Laboratorio de Biocatálisis de la EIB.

También quisiera agradecer de forma muy especial a Tanja Consolati por todo su apoyo y ayuda durante la elaboración de este manuscrito.

Y por último mi más profundo agradeciendo a mi familia, mis padres, hermanos, sobrinos...por su todo su amor, entrega y apoyo pese a la distancia.

Índice General

Agradecimientos	iii
Índice General	v
Índice de Figuras.....	x
Índice de Tablas.....	xii
Abreviaturas.....	xiii
Abstract.....	1
Introducción General	3
1. Lipasas, biocatalizadores muy versátiles.....	3
2. Mejora de las propiedades catalíticas de enzimas para el desarrollo de biocatalizadores.	5
3. Modificación química de proteínas	6
3.1. <i>Aminoácidos naturales y su reactividad</i>	6
3.2. <i>Modificación química de la cisteína.</i>	8
3.3. <i>Modificación química de proteínas en fase sólida</i>	11
Objetivos.....	13
1. Capítulo 1: Glicosilación química en fase sólida de lipasas	15
1. Introducción	15
2. Objetivo.....	17
3. Materiales y Métodos.....	18
3.1. <i>General</i>	18
3.2. <i>Preparación de dextranos aldehídos (Dext-CHO)</i>	18
3.3. <i>Inmovilización de lipasas en Octil-agarosa</i>	18
3.4. <i>Aminación química en fase sólida de CALB.</i>	18
3.5. <i>Modificación de CALB con dextrano-CHO</i>	18
3.6. <i>Modificación de CALB aminada (CALBNH₂) con dextrano-CHO</i>	19
3.7. <i>Ensayo de actividad Enzimática (pNPB)</i>	19
3.8. <i>Ensayos de termoestabilidad de las preparaciones de CALB</i>	19
3.9. <i>Electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)</i>	19
3.10. <i>Espectrometría de Dicroísmo Circular (DC)</i>	19
3.11. <i>Espectrometría de Fluorescencia</i>	20
3.12. <i>Transesterificación enzimática de glicerol con dietetil fenilmalonato (2)</i>	20
3.13. <i>Transesterificación enzimática de glicerol con metil butirato (2)</i>	20
3.14. <i>Hidrolisis enzimática de dimetil fenilglutarato (4)</i>	21

4. Resultados	22
4.1. Preparación de los oligosacáridos y glicosilación química de lipasas.	22
4.2. Caracterización estructural de la CALB glicosilada químicamente.	23
4.3. Efecto sobre la actividad y la estabilidad de los catalizadores de CALB.....	24
4.4. Síntesis cinéticamente controlada de ésteres de glicerina, catalizada por derivados glicosilados de CALB.....	25
4.5. Aplicación a otras enzimas y resolución de ésteres quirales.....	27
5. Conclusiones	29
2. Capítulo 2: Estabilización de la conformación abierta de la lipasa mediante la ligación de 2 cisteínas.	31
1. Introducción	31
2. Objetivo general.....	34
3. Materiales y Métodos.....	35
3.1. Reactivos.....	35
3.2. Mutagénesis dirigida de BTL	35
3.3. Clonaje, expresión y purificación.	35
3.4. Inmovilización en agarosa activada con Bromuro de cianógeno (BrCN)	36
3.5. Ensayo de actividad Enzimática (pNPB).....	36
3.6. Ensayo de actividad enzimática frente a ésteres con diferentes longitud de cadena.	36
3.7. Inhibición irreversible de los catalizadores por dietil-p-nitrofenilfosfato (D-pNP).....	37
3.8. Cuantificación de grupos tioles de los catalizadores inmovilizados	37
3.9. Inducción de la formación de enlace disulfuro.....	37
3.10. Ligación de las cisteínas del mutante BTL-C65S/C296C/A192C/F207C (BTL-DSSD).....	38
3.11. Espectrometría de Fluorescencia	38
3.12. Hidrolisis enantioselectiva de feniletil acetato (5).....	38
3.13. Hidrolisis enantioselectiva de etil-2-hidroxi-4-fenilbutirato (6) (HPBet)	38
3.14. Hidrolisis enantioselectiva de Ácido (±)-2-O-butiril-2-fenilacético (7)	39
3.15. Hidrolisis enantioselectiva de dimetilfenilglutarico (4)	39
4. Resultados	40
4.1. Estudio bioinformático y diseño del mutante BTL.....	40
4.2. Formación de enlace disulfuro	41
4.3. Estrategia de ligación de cisteínas introducidas en la zona del lid.	42
4.4. Estudios estructurales: espectrometría de fluorescencia.	45
4.5. Evaluación de las propiedades catalíticas.....	46
5. Conclusiones	52

3. Capítulo 3: Bioconjugación de polímeros y péptidos con lipasas inmovilizadas: desarrollo de lipasas semisintéticas.	53
1. Introducción	53
2. Objetivos	55
3. Materiales y Métodos.....	57
3.1. <i>Reactivos</i>	57
3.2. <i>Mutagénesis dirigida de BTL</i>	57
3.3. <i>Clonaje, expresión y purificación.</i>	57
3.4. <i>Inmovilización en agarosa activada con Bromuro de cianógeno (BrCN)</i>	57
3.5. <i>Ensayo de actividad Enzimática (pNPB)</i>	57
3.6. <i>Inhibición irreversible de los catalizadores por dietil-p-nitrofenilfosfato (D-pNP)</i>	58
3.7. <i>Cuantificación de grupos tioles de los catalizadores inmovilizados</i>	58
3.8. <i>Preparación de los polímeros</i>	58
3.9. <i>Péptidos</i>	59
3.10. <i>Protección del tiol de los distintos mutantes de BTL.</i>	59
3.11. <i>Incorporación de los polímeros hechos a medida.</i>	59
3.12. <i>Incorporación de péptidos hechos a medida.</i>	59
3.13. <i>Reacción de desulfuración.</i>	59
3.14. <i>Espectrometría de masas (MALDI-TOF-MS)</i>	60
3.15. <i>Espectrometría de Fluorescencia</i>	60
3.16. <i>Espectrometría de Dicroísmo Circular (DC)</i>	60
3.17. <i>Determinación de los parámetros cinéticos de mutantes los conjugados lipasa-péptidos.</i> ..	60
3.18. <i>Hidrólisis de timidina per-acetilada.</i>	60
3.19. <i>Hidrólisis de glucal per-acetilado.</i>	60
3.20. <i>Hidrólisis enzimática de dimetilfenilglutarato.</i>	61
4. Resultados	62
4.1. <i>Conjugación con polímeros</i>	62
4.2. <i>Conjugación con péptidos</i>	71
5. Conclusiones	84

4. Capítulo 4: Rediseño del sitio activo de BTL: incorporación dirigida de grupos funcionales no naturales mediante modificación química.	87
1. Introducción	87
2. Objetivo.....	89
3. Materiales y Métodos.....	90
3.1. <i>Reactivos</i>	90
3.2. <i>Mutagénesis dirigida de BTL</i>	90
3.3. <i>Clonaje, expresión y purificación</i>	91
3.4. <i>Inmovilización en agarosa activada con Bromuro de cianógeno (BrCN)</i>	91
3.5. <i>Ensayo de actividad Enzimática (pNPB)</i>	91
3.6. <i>Cuantificación de grupos tioles de los catalizadores inmovilizados</i>	91
3.7. <i>Modificación química dirigida de BTL utilizando metanotiosulfonatos derivados</i>	91
3.8. <i>Determinación de los parámetros cinéticos de mutantes en la posición Phe17</i>	92
3.9. <i>Hidrolisis enzimática de Acido (\pm)-2-hidroxi-4-fenilbutirato de etilo (HPBet) (6)</i>	92
3.10. <i>Hidrolisis de enantioselectiva de Acido (\pm)-2-O-butiril-2-fenilacético (7)</i>	92
4. Resultados	93
4.1. <i>Estudio bioinformático y diseño de las mutaciones en el sitio activo de BTL</i>	93
4.2. <i>Modificación de los mutantes con MTS derivados</i>	94
4.3. <i>Evaluación de las propiedades catalíticas de los mutantes de BTL modificados químicamente</i>	95
4.4. <i>Estudio de la enantioselectividad de los nuevos catalizadores modificados químicamente</i>	97
4.5. <i>Mutagénesis de saturación en el sitio activo de BTL: estudio del amino ácido F17</i>	100
5. Conclusiones	104
5. Capítulo 5. Desarrollo de catalizadores híbridos: Anclaje de complejos organometálicos en el sitio activo de lipasas inmovilizadas.	105
1. Introducción	105
2. Objetivos	107
3. Materiales y Métodos.....	108
3.1. <i>Reactivos</i>	108
3.2. <i>Purificación de lipasas comerciales</i>	108
3.3. <i>Inmovilización en agarosa activada con Bromuro de cianógeno (BrCN)</i>	108
3.4. <i>Inmovilización de lipasas en Lewatit</i>	108
3.5. <i>Preparación de soportes Sepabeads-aldehídos (SP-CHO)</i>	108
3.6. <i>Inmovilización en soportes Sepabeads-aldehídos (SP-CHO)</i>	109
3.7. <i>Inmovilización en soportes Sepabeads-aldehídos (SP-CHO) y funcionalización de su superficie</i>	109
3.8. <i>Ensayo de actividad Enzimática (pNPB)</i>	109

3.9.	<i>Inhibición irreversible de los catalizadores por dietil-p-nitrofenilfosfato (D-pNP)</i>	109
3.10.	<i>Incorporación del complejo organometálico COM</i>	109
3.11.	<i>Síntesis de bifenilo mediante la reacción de Suzuki-Miyaura.</i>	109
3.12.	<i>Síntesis de cinamato de etilo mediante la reacción de Suzuki-Miyaura.</i>	110
4.	Resultados	111
4.1.	<i>Desarrollo de metaloproteínas artificiales.</i>	111
4.2.	<i>Evaluación funcional de los catalizadores híbridos en la reacción de Suzuki.</i>	113
4.3.	<i>Evaluación funcional de los catalizadores híbridos en la reacción de Heck.</i>	114
5.	Conclusiones	119
	Conclusiones Generales	121
	Referencias	123
	Anexos	133

Índice de Figuras

FIGURA 1.1. ESQUEMA GENERAL DE LA GLICOSILACIÓN EN FASE SOLIDA DE CALB	22
FIGURA 1.2. ELECTROFORESIS DE CALB GLICOSILADA QUÍMICAMENTE	23
FIGURA 1.3. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS CATALIZADORES GLICOSILADOS DE CALB	24
FIGURA 1.4. EFECTO DE LA GLICOSILACIÓN QUÍMICA SOBRE LAS PROPIEDADES CATALÍTICAS DE CAL Y SUS DERIVADOS	25
FIGURA 1.5. TRANSESTERIFICACIÓN DE GLICERINA CON METIL BUTIRATO.	27
FIGURA 2.1. DIFERENTES ESTADIOS DE OXIDACIÓN DE CISTEÍNA.....	31
FIGURA 2.2. GEOMETRÍA DE UN PUENTE DISULFURO.....	32
FIGURA 2.3. MECANISMO DE FORMACIÓN DE ENLACES DISULFURO <i>IN VITRO</i>	33
FIGURA 2.4. DISEÑO DEL MUTANTE DE BTL-C65S/C296S/A192C/F207C.	40
FIGURA 2.5. ESQUEMA DE LA ESTRATEGIA DE CICLOS SUCEIVOS DE OXIDACIÓN.....	43
FIGURA 2.6. EVOLUCIÓN DE DISTINTOS PARÁMETROS DE BRCN-DSSD DURANTE LOS CICLOS DE OXIDACIÓN/REDUCCIÓN....	44
FIGURA 2.7. ESPECTRO DE FLUORESCENCIA DE LOS CATALIZADORES DE BTL.	46
FIGURA 2.8. ACTIVIDAD DE LOS CATALIZADORES DE BTL FRENTE A PNP'S DE DISTINTO LONGITUD LARGO DE CADENA.....	47
FIGURA 2.9. ACTIVIDAD RELATIVA A DIFERENTES FUERZAS IÓNICAS.	48
FIGURA 2.10 ACTIVIDAD V/S TEMPERATURAS DE BTL-WT Y BTL-DSSD.	48
FIGURA 2.11. ESTABILIDAD TÉRMICA A PH 55°C DE LOS DERIVADOS INMOVILIZADOS BTL-WT Y BTL-DSSD	49
FIGURA 2.12. ESQUEMA DEL CAMBIO EN LA CONFORMACIÓN DE LA ESTRUCTURA DE LA LIPASA.	51
FIGURA 3.1. ESQUEMA DE LA SÍNTESIS DE LOS TIO-POLÍMEROS UTILIZADOS.	58
FIGURA 3.2. COMPARACIÓN DE LAS ESTRUCTURAS DE BTL EN SUS DOS CONFORMACIONES: CERRADA Y ABIERTA.....	62
FIGURA 3.3. ESQUEMA DE LA CONJUGACIÓN SITIO ESPECÍFICA DE LIPASA Y POLÍMEROS.....	63
FIGURA 3.4. ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE LOS DISTINTOS CONJUGADOS LIPASA-POLÍMEROS.....	64
FIGURA 3.5. INHIBICIÓN IRREVERSIBLE CON D-PNP DE LOS DIFERENTES CONJUGADOS DE BTL	65
FIGURA 3.6. ESQUEMA DE LA COMPOSICIÓN AMINOACÍDICA DEL LID DE BTL	71
FIGURA 3.7. ESQUEMA DE LA CONJUGACIÓN SITIO ESPECÍFICA DE LIPASA Y PÉPTIDOS	72
FIGURA 3.8. ESPECTRO DE MASAS (MALDI-MS) DE LOS MUTANTES Y CONJUGADOS.....	73
FIGURA 3.9. ESPECTROS DE DICROÍSMO CIRCULAR DE BTL Y SUS CONJUGADOS.....	74
FIGURA 3.10. ESPECTROS DE FLUORESCENCIA DE LOS DE BTL Y SUS CONJUGADOS	75
FIGURA 3.11. INHIBICIÓN IRREVERSIBLE CON D-PNP DE BTL Y SUS CONJUGADOS	75
FIGURA 3.12. RESULTADOS DE LA DINÁMICA MOLECULAR DE BTL*-A193C-P1.....	77
FIGURA 3.13. RESULTADOS DE LA DINÁMICA MOLECULAR DE BTL*-S196C-P2.....	78
FIGURA 3.14. ESPECTROS DE FLUORESCENCIA DE LA BIBLIOTECA CATALIZADORES DE BTL	79
FIGURA 4.1 MECANISMO DE REACCIÓN DE COMPUESTOS METANOTIOSULFONATOS CON CISTEÍNAS.....	88
FIGURA 4.2 REPRESENTACIÓN DE LA SUPERFICIE DEL SITIO ACTIVO DE LA LIPASA BTL.	93
FIGURA 4.3 ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE MTS DE BTL	95
FIGURA 4.4 PERFILES DE HIPERACTIVACIÓN DE LAS DISTINTAS LIPASAS ARTIFICIALES	96

FIGURA 4.5 RESOLUCIÓN CINÉTICA DE (6) CATALIZADA POR LA BIBLIOTECA DE CATALIZADORES DE BTL	97
FIGURA 4.6 RESOLUCIÓN CINÉTICA DE (7) CATALIZADA POR LA BIBLIOTECA DE CATALIZADORES DE BTL	99
FIGURA 4.7 RESOLUCIÓN CINÉTICA DE (7) CON DISTINTOS MUTANTES DE BTL EN LA POSICIÓN 17.....	102
FIGURA 5.1 ESQUEMA GENERAL DE METALOENZIMAS ARTIFICIALES.....	106
FIGURA 5.2 MECANISMO DE ACCIÓN DE INHIBIDOR DE ACETILCOLINESTERASA (D-PNP) Y DE ANCLAJE DEL COMPLEJO ORGANOMETÁLICO (COM).	111
FIGURA 5.3 ANCLAJE DEL COMPLEJO ORGANOMETÁLICO (COM).	112
FIGURA 5.4. ELECTROFORESIS DE LOS CATALIZADORES HÍBRIDOS.....	115
FIGURA 5.5 ESQUEMA DE LA INMOVILIZACIÓN DE CALB EN SP-CHO Y POSTERIOR MODIFICACIÓN DE LA SUPERFICIE DEL SOPORTE.	116
FIGURA 5.6. RECICLAJE DEL CATALIZADOR HÍBRIDO SP-CALB-C ₈ -COM.	117

Índice de Tablas

TABLA 1. ESTRATEGIAS MÁS COMUNES DE MODIFICACIÓN QUÍMICA DE AMINOÁCIDOS NATURALES.	7
TABLA 1.1. TRANSESTERIFICACIÓN DE DIETILFENILMALONATO (2) CON GLICEROL CATALIZADO POR DIFERENTES CATALIZADORES DE CALB.....	26
TABLA 1.2. TRANSESTERIFICACIÓN DE METILBUTIRATO (3) CON GLICEROL CATALIZADO POR DIFERENTES CATALIZADORES DE CALB.....	26
TABLA 1.3. HIDROLISIS ASIMÉTRICA DE DIMETILFENIL GLUTARATO (4) CATALIZADA POR LIPASAS QUÍMICAMENTE GLICOSILADAS.....	28
TABLA 2.1. PRIMERS UTILIZADOS PARA LA MUTAGÉNESIS DIRIGIDA DE BTL	36
TABLA 2.2. CISTEÍNAS LIBRES Y ACTIVIDAD ESPECÍFICA DEL MUTANTE BTL-DSSD	42
TABLA 2.3. RESOLUCIÓN CINÉTICA DE DIVERSOS ESTERES CON BTL-WT	50
TABLA 3.1. PRIMERS UTILIZADOS PARA LA MUTAGÉNESIS DIRIGIDA DE BTL.	57
TABLA 3.2. HIDROLISIS DE TIMIDINA PER-ACETILADA CON LOS DIFERENTES BIOCATALIZADORES A PH 7.0	67
TABLA 3.3. HIDROLISIS DE TIMIDINA PER-ACETILADA CON LOS DIFERENTES BIOCATALIZADORES A PH 5.0	68
TABLA 3.4. HIDROLISIS DE DIMETILFENILGLUTARICO CON LOS DIFERENTES BIOCATALIZADORES A PH 7.0	69
TABLA 3.5. HIDROLISIS DE DIMETILFENILGLUTARICO CON LOS DIFERENTES BIOCATALIZADORES A PH 5.0	70
TABLA 3.6. PARÁMETROS CINÉTICOS DE LOS CONJUGADOS DE BTL EN LA HIDROLISIS DE PNPB.....	76
TABLA 3.7. SECUENCIA DE LOS DIFERENTES PÉPTIDOS UTILIZADOS	78
TABLA 3.8. HIDROLISIS DE TIMIDINA PER-ACETILADA CON LOS DIFERENTES CONJUGADOS LIPASA-PÉPTIDOS A PH 7.0	80
TABLA 3.9. HIDROLISIS DE TIMIDINA PER-ACETILADA CON LOS DIFERENTES CONJUGADOS LIPASA-PÉPTIDOS A PH 5.0	81
TABLA 3.10. HIDROLISIS DE GLUCAL PERACETILADO CON LOS DIFERENTES CONJUGADOS LIPASA-PÉPTIDOS A PH 7.0	82
TABLA 3.11. HIDROLISIS DE DIMETILFENILGLUTARICO CON LOS DIFERENTES CONJUGADOS LIPASA-PÉPTIDO A PH 7.0	83
TABLA 4.1. PRIMERS UTILIZADOS PARA LA MUTAGÉNESIS DIRIGIDA DE BTL	90
TABLA 4.2. PRIMERS UTILIZADOS PARA LA MUTAGÉNESIS DIRIGIDA DE BTL EN LA POSICIÓN 17.	91
TABLA 4.3 RENDIMIENTO DE MODIFICACIÓN DE LOS MUTANTES DE BTL	94
TABLA 4.4. RESUMEN DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS DE LOS DISTINTOS MUTANTES DE BTL EN LA POSICIÓN 17	101
TABLA 5.1 REACCIÓN DE SUZUKI-MIYaura CATALIZADA POR COM Y DISTINTOS CATALIZADORES HÍBRIDOS ...	113
TABLA 5.2. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE REACCIÓN DE HECK CATALIZADA POR COM Y DISTINTOS CATALIZADORES HÍBRIDOS.....	114
TABLA 5.3. REACCIÓN DE HECK CATALIZADA POR COM Y DISTINTOS CATALIZADORES HÍBRIDOS.....	116

Abreviaturas

BTL: Lipasa de *Geobacillus Thermocatenolatus*
CALB: Lipasa de *Candida antarctica* B
CLL: Lipasa de *Candida cylindracea*
COM: Complejo organometálico de Pd
CTAB: bromuro de hexadeciltrimetilamonio
DC: Dicroísmo circular
Dext-CHO: dextrano aldehídos
DTT: Ditiotreitól
D-pNP: dietil-p-nitrofenilfosfato
EDA: etilendiamina
EDC: etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
GndCl: hidrocloreuro de guanidina
GSSG: glutatión
HMPT: Tris(dimetilamino) fosfina
MTS-A: Alilo-metanotiosulfonato
MTS-B: 3-butino-metanotiosulfonato
MTS-Q, 2-quinuclidine etil metanotiosulfonato
NaBH₄: borohidruro de sodio
NaIO₄: peryodato de sodio
pNPB: p-nitrofenol butirato
PFL: Lipasa de *P. fluorescens*
RML: Lipasa de *R. miehei*
ROL: Lipasas de *R. oryzae*
TBaBr: tetrabutilamonio bromuro
TLL: Lipasa de *Thermomyces lanuginosus*
Tx: Tritón-X100

Abstract

Abstract

Enzymes are versatile biocatalysts finding an increasing application in many industrial fields including fine and organic chemistry, pharmacy, cosmetics or food industry. The enzymes unsurpassed chemo-, regio- and enantioselectivity characteristics are making them interesting as fine chemistry biocatalysts since the preparation of pure intermediates is a key step for many industrially relevant processes. However, when using non-natural substrates enzyme specificity may not be as high as required for industrial purposes requesting the need of improvement of this enzyme property, possible through very different techniques, like screening, controlled immobilization, enzyme engineering, directed evolution and rational design approaches, chemical modification or combinations thereof.

Strategies for the selective and efficient chemical modification of proteins have been implemented successfully for the study and modulation of enzyme specificity. However, despite the efforts made the past years the site-directed incorporation of different moieties, like carbohydrates, peptides, polymers, DNA, etc. specifically to the required position at the enzyme remains a challenging task. Applying conventional methods of chemical modification on a protein attached covalently or reversible to a surface or matrix can provide an important simplification of current protocols of modification.

The main objective of this Doctoral Thesis has been the development and implementation of new strategies of site-directed chemical modifications of proteins on solid phase to improve their catalytic properties. Joining genetic and chemical modification approaches 5 strategies were developed using immobilized lipases as model enzymes:

- Chemical glycosylation of lipases on solid phase
- Promotion of the open conformation of lipase by two cysteine ligation
- Development of semisynthetic lipases conjugates
- Active center redesign with non-natural moieties
- Development of hybrid catalysts: lipase active-site anchoring of organometallics

These strategies were successfully applied, obtaining modified proteins with quantitative yields in almost all the cases. These new modified lipases showed improved activity, regioselectivity, enantioselectivity in several important biotransformations. The strategies developed during this thesis combine simplified and easy handling of the enzyme during all modification steps with highly selective chemical modification protocol. Methods are potentially extendable to other proteins and fields therefore offering general strategies for obtaining improved enzyme variants applying solid-phase chemical modification strategies.

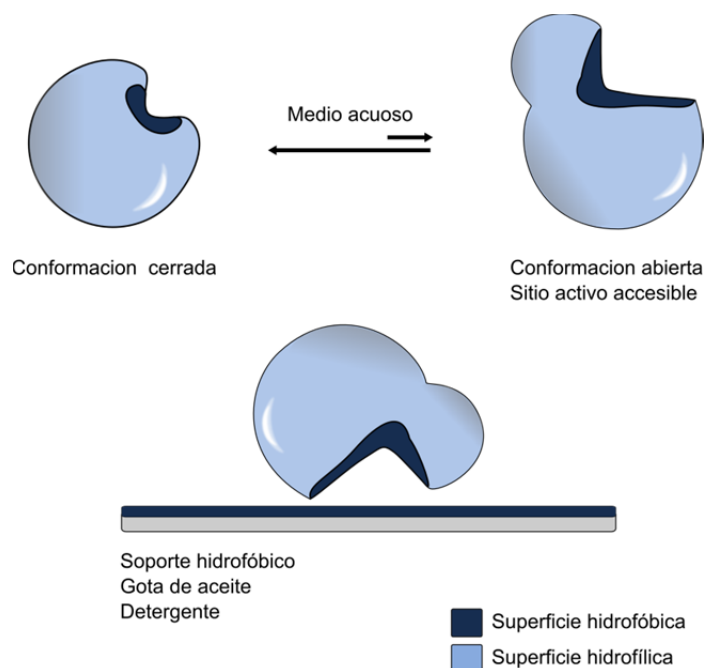
Introducción General

1. Lipasas, biocatalizadores muy versátiles

Las enzimas son biocatalizadores muy versátiles y con una creciente aplicación en diversas áreas tales como la industria química y farmacéutica, biocombustibles, industria papelera, industria alimentaria, entre otros (Bornscheuer et al. 2012; Muñoz Solano et al. 2012; Pérez-Sánchez et al. 2013). Su uso en biotransformaciones presenta varias ventajas, como su quimio-, regio- y estereoselectividad, además muestran una alta reactividad a condiciones moderadas de reacción, donde la generación de subproductos es minimizada.

Dentro de la gran diversidad de enzimas, las lipasas (acil-hidrolasas) son unas de las más utilizadas en química fina y aunque su función natural es la de hidrolizar grasas y aceites, son enzimas muy versátiles capaces de reconocer distintos sustratos no naturales y catalizar exitosamente diversas reacciones tanto en medios acuosos como en disolventes orgánicos (Gotor-Fernandez et al. 2006). Las lipasas han sido utilizadas en la resolución cinética de mezclas racémicas de alcoholes, ésteres o aminas (Pàmies y Bäckvall 2004; Faber 2011), así también en la desimetrización de compuestos proquirales (García-Urdiales et al. 2011; Palomo y Cabrera 2012) y procesos regioselectivos de protección y/o deprotección (Ferrero y Gotor 2000; Filice y Palomo 2012). Además recientemente, ha surgido un gran interés en su capacidad de catalizar reacciones no convencionales, por ejemplo condensaciones aldólicas, adiciones de Michael, entre otras (Busto et al. 2010; Humble y Berglund 2011).

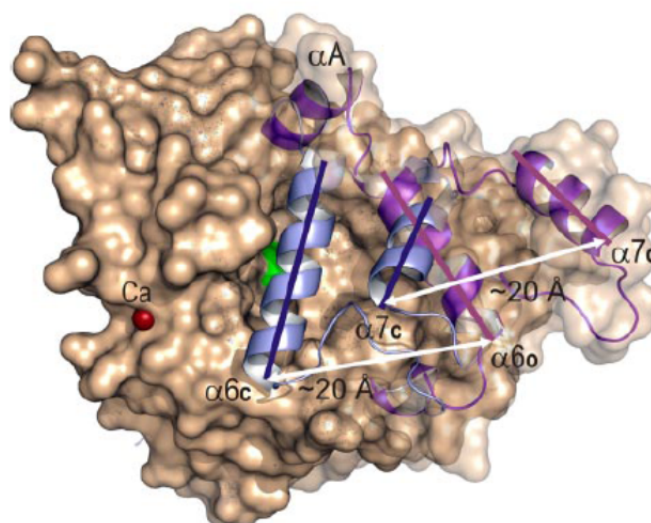
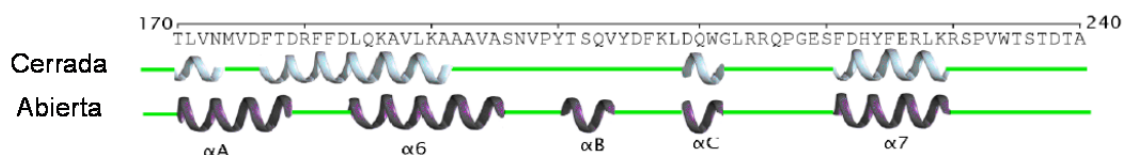
Desde un punto de vista estructural, las lipasas son proteínas con un mecanismo catalítico muy complejo, que involucra grandes cambios conformacionales en su estructura. Estas pueden encontrarse en dos estados conformacionales: una forma cerrada y una forma abierta (ver Esquema 1).



Esquema 1. Activación interfacial de lipasas

En la primera el sitio activo se encuentra aislado del medio de reacción por una cadena oligopeptídica, llamada lid o tapadera. En cambio en la forma abierta, el lid se desplaza dejando el sitio catalítico expuesto al medio. En medios acuosos homogéneos existe un equilibrio entre sus dos conformaciones, el cual se encuentra desplazado mayoritariamente hacia su forma cerrada. Sin embargo en presencia de superficies hidrofóbicas (Verger 1997; Palomo et al. 2002b; Fernandez-Lorente et al. 2007) (como por ej., superficies hidrofóbicas, gotas de aceites, detergentes, etc) este se desplaza hacia la forma abierta. Este fenómeno se conoce como activación interfacial (Verger 1997).

Un caso muy especial, es la lipasa de *Geobacillus thermocatenulatus* (BTL). Esta lipasa termoalcalófila con un peso molecular de 43 kDa (Schmidt-Dannert et al. 1996) tiene la particularidad de ser la primera lipasa cristalizada que presenta 2 lids (las hélices $\alpha 6$ y $\alpha 7$, que se muestran en el Esquema 2.A) (Carrasco-Lopez et al. 2009). El cambio entre sus conformaciones cerrada y abierta involucra un dramático cambio conformacional, donde los dos lids que cubren el sitio activo se desplazan alrededor de 20 Å (Esquema 2.A). Así mismo, este cambio produce la formación de nuevas estructuras secundarias en la zona del lid (Esquema 2.B). La totalidad del proceso de activación de la enzima resulta en la reagrupación de alrededor de 70 amino ácido, comprendidos entre la región Thr169 y Asp239 (Carrasco-Lopez et al. 2009).

A**B**

Esquema 2. A) Cambios estructurales de BTL2 después de la activación. **B)** Cambios en la estructura secundaria del lid, entre la forma cerrada y abierta.

Además de los aspectos estructurales donde está involucrado el lid, este cambio conformacional tiene un papel crucial en las propiedades catalíticas de las lipasas. Considerando los cambios conformacionales durante la

activación interfacial de las lipasas, es posible modificar las propiedades catalíticas de la enzima modulando el equilibrio entre las formas cerradas y abiertas (Palomo et al. 2002a; Palomo 2008, 2009; Palomo y Guisan 2012). Bajo este punto la lipasa BTL se presenta como un interesante modelo ya que al poseer 2 lids, mediante la modificación específica en la zona sería posible la modulación y mejora de sus propiedades catalíticas para su uso como biocatalizador en diversas biotransformaciones.

2. Mejora de las propiedades catalíticas de enzimas para el desarrollo de biocatalizadores.

Pese a que los procesos catalizados por enzimas presentan muchas ventajas, especialmente en términos de actividad, especificidad y selectividad, puede ocurrir que una enzima en cuestión no cumple con los requisitos adecuados para llevar a cabo una determinada tarea (Morley y Kazlauskas 2005). Esto hace necesario la mejora en las propiedades de la enzima. Diferentes metodologías han sido aplicadas para mejorar las propiedades catalíticas de diversas enzimas tales como: screening (Fernández-Arrojo et al. 2010), inmovilización controlada (Palomo 2008, 2009), ingeniería de enzimas (Bornscheuer y Pohl 2001), evolución dirigida (Reetz 2002) y modificación química de proteínas (Díaz-Rodríguez y Davis 2011).

Una de las herramientas más poderosas para la mejora de las propiedades de las enzimas es la inmovilización. Un correcto diseño y aplicación de esta herramienta permite solucionar los dos principales problemas presentes en el uso de enzimas a nivel industrial (Cao et al. 2003; Mateo et al. 2007; Sheldon y Van Pelt 2013): (i) la solubilidad de las enzimas dificultan su separación del medio de reacción y su re-utilización en posteriores ciclos de reacción y (ii) la baja estabilidad operacional.

Además mediante diferentes estrategias de inmovilización se ha podido modular las propiedades de las enzimas. La combinación de la naturaleza del soporte (resinas epoxi acrílicas, polisacáridos, silica, etc) y la metodología utilizada (enlace covalente, intercambio iónico, adsorción hidrofóbica, etc) puede ser crucial y afectar una propiedad específica de una enzima (Palomo 2009). En el caso de las lipasas es particularmente crítico ya que alteraciones en el equilibrio entre sus dos conformaciones o cambios en su estructura puede promover grandes en su selectividad. A través de la aplicación de diversos protocolos de inmovilización, que involucren diferentes áreas de la enzima, confieran diferentes grados de rigidificación, o generen un microambiente alrededor de la enzima, es posible crear una biblioteca de biocatalizadores con diferentes propiedades (Palomo 2008, 2009). La combinación de ésta estrategia con otras, como evolución dirigida, diseño racional o modificación química mediante una combinatoria daría acceso a amplias bibliotecas con nuevas enzimas con nuevas y mejores propiedades.

3. Modificación química de proteínas

Las modificaciones postransduccionales de las proteínas juegan un papel crucial dentro de la maquinaria celular, permitiendo modular la actividad, expandir la diversidad y la complejidad en la función biológica de las proteínas (Walsh et al. 2005). Existe una gran gama de modificaciones postransduccionales como glicosilación, acilación, fosforilación, metilación, sulfonilación, prenilación, ubiquitinación, etc. Todas ellas están involucradas en diversos roles tan amplios y diversos como , localización, plegamiento, estabilización de proteínas y activación de enzimas (Davis 2004; Gamblin et al. 2008).

Elucidar el rol de cada componente dentro de la complejidad y dinámica de las modificaciones postransduccionales requiere un exhaustivo y costoso trabajo de purificación. Mediante la modificación química de proteínas es posible resolver los problemas de homogeneidad y disponibilidad, ya que mediante una reacción selectiva hacia el residuo aminoacídico en cuestión es posible obtener la modificación natural (Davis 2004). Además, mediante la modificación química de proteínas es posible realizar alteraciones no naturales que permiten mejorar o alterar la función de una proteína específica. Por ejemplo, la incorporación de marcadores fluorescentes que permitan la localización y análisis de proteínas tanto *in vitro* como *in vivo*.

Todo lo anterior ha llevado a desarrollar diversas estrategias de modificación química. Todas estas herramientas que permiten mejorar las propiedades de proteínas, también han sido aplicadas al perfeccionamiento de biocatalizadores, permitiendo mejorar la actividad, estabilidad y selectividad de diversas enzimas entre ellas lipasas (Sletten y Bertozzi 2009; Díaz-Rodríguez y Davis 2011; Filice et al. 2011; Romero et al. 2012). Además, mediante todas estas herramientas de química de proteínas ha sido posible la creación de enzimas artificiales, con actividades no presentes en la naturaleza (Deuss et al. 2011).

3.1. Aminoácidos naturales y su reactividad

Diversas reacciones químicas permiten la conjugación de distintas moléculas (naturales y no naturales) con proteínas, y la mayoría de estas reacciones se basan en la reactividad de los aminoácidos naturales.

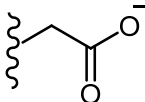
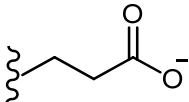
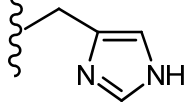
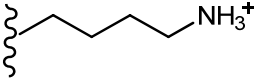
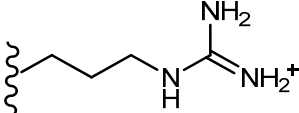
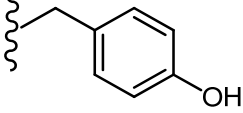
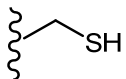
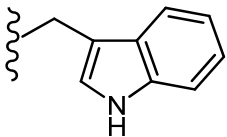
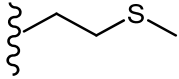
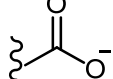
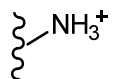
Al analizar la estructura de las proteínas, podemos concluir que en principio son 9 los aminoácidos derivatizables, los que poseen una cadena ionizable (Hermanson 2008). En Tabla 1 se resumen algunas de las estrategias de modificación química de aminoácidos naturales más utilizadas.

El método más común de conjugación de proteínas es la modificación de lisinas, típicamente con ésteres de NHS e isocianatos. Otro método comúnmente utilizado, es la activación del carboxilo terminal de la proteína o de la cadena lateral de glutamato o aspártico mediante el uso de carbodiimidas solubles en agua para la posterior reacción con aminas. La gran desventaja es la elevada densidad de lisinas, ácidos glutámicos y aspárticos en la superficie de la mayoría de las proteínas, limitando la utilización de estos métodos cuando se quiere una conjugación específica.

Una estrategia alternativa para alcanzar una modificación más selectiva, es la modificación de la cisteína con distintos reactivos como maleimidos, α -haloacetamidas o disulfuros. Es posible alcanzar una elevada

selectividad a pH neutro (pH 7-8), y si esto se combina con la introducción específica de la cisteína representa una herramienta muy eficaz y poderosa para lograr una modificación altamente selectiva.

Tabla 1. Estrategias más comunes de modificación química de aminoácidos naturales.

Aminoácido	Cadena lateral	Reactividad y referencias
Ácido Aspártico		- Formación de amidas (activación con carbodiimida y/o N-hidroxisuccinimida) (Hermanson 2008)
Ácido Glutámico		
Histidina		- α -haloacetatos (Hermanson 2008) - Ionización (Hermanson 2008)
Lisina		- Aminación reductiva (McFarland y Francis 2005) - Iminoboronatos (Cal et al. 2012) - α -haloacetatos (Hermanson 2008) - Isocianatos y isotiocianatos (Hermanson 2008) - Esteres de N-hidroxisuccinimida - Imido esterres
Arginina		- Formación de amidas (Hermanson 2008) - Derivados de fenilgloxal (Poltz et al. 1981)
Tirosina		- Modificación de reacción de Mannich (Joshi et al. 2004) - Reacción click con PTADs (Ban et al. 2013) - Ionización (Hermanson 2008) - Sales de nitro-diazonio (Schlick et al. 2005) - Alquilación mediante complejos π -alil-paladio (Tilley y Francis 2006)
Cisteína		- Entrecruzamiento oxidativo (Kodadek et al. 2005) - Intercambio tiol-disulfuro - α -haloacetatos (Hermanson 2008) - Alquilos de iodoacetamida - Maleimidos - Acoplamiento tiol-eno
Triptofano		- Conversión a deshidroalanina (Bernardes et al. 2008a) - Carbenoides de rodio (Antos y Francis 2004) - Reactivo de Koshland (Koshland Jr et al. 1964)
Metionina		- α -haloacetatos (Gundlach et al. 1959)
C-terminal		- Formación de amidas (activación con carbodiimidas y/o N-hidroxisuccinimida) (Hermanson 2008)
N-terminal		- α -haloacetatos - Isocianatos y isotiocianatos - Esteres de N-hidroxisuccinimida - Imido esterres (Hermanson 2008)

Además de estos métodos continuamente se está en busca de nuevas estrategias o mejorar las existentes para lograr modificaciones altamente específicas. Durante la última década se han descrito un importante número de estrategias selectivas mediante modificaciones de los reactivos existentes (Smith et al. 2010; Toda et al. 2013), o hacia otros aminoácidos naturales poco abundantes como triptófano (Antos y Francis 2004) y tirosina (Carrico 2008; Sletten y Bertozzi 2009; Ban et al. 2013).

Adicionalmente cuando la selectividad alcanzada mediante las técnicas clásicas de conjugación no es suficiente o es necesario modificar específicamente una proteína con más de una molécula, la introducción de aminoácidos no naturales representa una interesante alternativa (De Graaf et al. 2009; Sletten y Bertozzi 2009). Distintos aminoácidos no naturales han podido ser introducidos mediante diversas estrategias, otorgando nuevas posibilidades para conjugaciones ortogonales de proteínas y creando nuevas y diversas funcionalidades como alquino y azida, ceto/aldehído, p-halofenilalaninas, grupos fotoreactivos, entre otros (Carrico 2008; Sletten y Bertozzi 2009).

Actualmente existen mayoritariamente 3 estrategias para la incorporación de aminoácidos no naturales, cada una con sus limitaciones (De Graaf et al. 2009). La primera consiste en el uso de cepas auxotróficas, las cuales son incapaces de sintetizar un aminoácido determinado (usualmente metionina). Previo a la inducción de la proteína se adiciona de un homólogo no natural que esta incorporara en cada posición donde se encontraba el aminoácido no codificable. La gran limitante es que dependiendo de la proteína es posible incorporar varias copias del aminoácido no natural causando una baja selectividad del método (Kiick et al. 2001).

Otra estrategia es el uso conjunto de aminoacil-tRNA sintetasa/supresor de codones sin sentido, permitiendo la introducción sitio específica dentro de una proteína de un aminoácido no-natural (Noren et al. 1989). Las desventajas de este método, es una disminución en los niveles de la expresión de la proteína y dependiendo de la proteína y posición donde se quiera modificar se puede obtener una baja eficiencia en la incorporación del aminoácido no-natural.

El último método es la ligación química nativa, que consiste en la construcción de un polipéptido o proteína más grande formada por el ensamblaje de dos o más segmentos peptídicos no protegidos sintetizados en fase sólida (Hackenberger y Schwarzer 2008). Durante la síntesis de los péptidos es posible introducir fácilmente diversas funcionalidades no naturales. La gran desventaja de este método es que es solo accesible para la síntesis de pequeñas proteínas no muy complejas.

La modificación sitio-específica de una proteína con aminoácidos no naturales presenta aún grandes desafíos que resolver para lograr ser una técnica fácilmente aplicable y universal. Es así que aún los aminoácidos naturales son el objetivo preferible para cualquier modificación.

3.2. *Modificación química de la cisteína.*

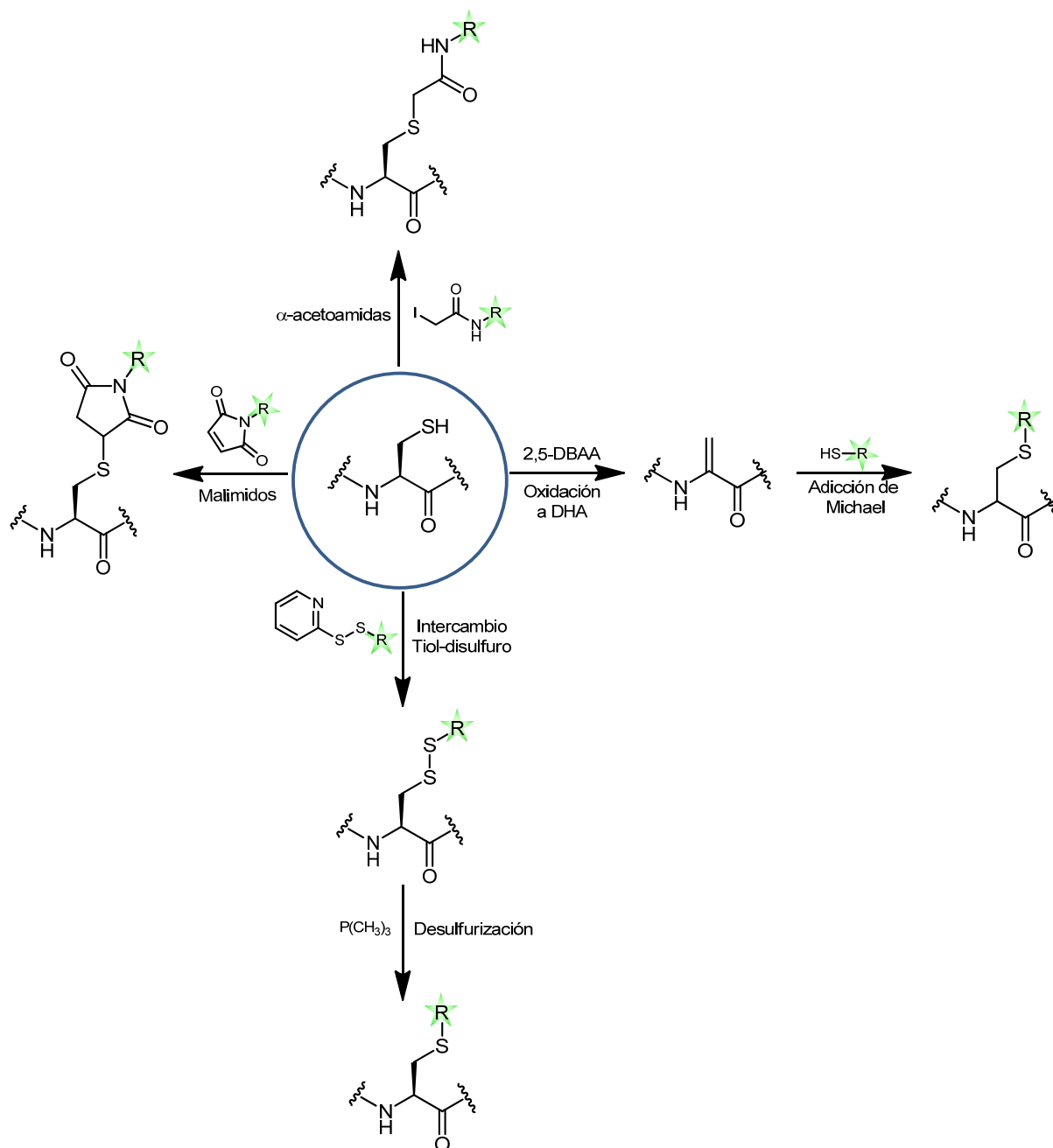
Dentro de los aminoácidos naturales, la cisteína es el objetivo más conveniente para la modificación sitio selectiva de proteínas (Chalker et al. 2009). El grupo sulfhídrido de su cadena lateral posee un fuerte carácter

nucleofílico, otorgándole excelentes características para la modificación. Además, la cisteína posee una abundancia relativa muy baja, esto combinado con técnicas convencionales de mutagénesis dirigida, es posible construir un mutante para una sola cisteína virtualmente en cualquier posición de la proteína.

Como se ha mencionado anteriormente (Tabla 1), el grupo sulfhídrido de la cisteína puede ser selectivamente modificado mediante diversas estrategias químicas (Hermanson 2008; Chalker et al. 2009).

En el Esquema 3, se muestran las estrategias más comunes para la modificación química de cisteínas.

- Haluro-carbonilos. La alquilación directa con electrófilos, como α -haloacetamidas es uno de los primeros métodos para la modificación de cisteínas. Mediante un cuidadoso control de pH es posible lograr una modificación específica de la cisteína, respecto a otros nucleófilos como N-terminal o lisinas (Hermanson 2008).
- Aceptores de Michael. Maleimidos, vinil sulfonas u otros compuestos α,β -insaturados son los aceptores de Michael más usados para la modificación de proteína. Que la conjugación se realice a pH neutros (6.5-7.5), en medios acuosos y con un ligero exceso de agente modificante (5-10 equivalentes) y la elevada selectividad hacia las cisteínas hace de los maleimidos uno de los reactivos más utilizados al día de hoy para la modificación selectiva de proteínas (Hermanson 2008).
- Disulfuros. La formación de disulfuros es una de las modificaciones postransduccionales más comunes, y ha sido ampliamente utilizada como una estrategia química de modificación de proteínas. En la modificación química selectiva de la cisteína en una proteína mediante intercambio disulfuro generalmente se utilizan reactivos activados con 5,5'-ditiobis 2 ácido nitrobenzoico (DTNB), 2-dipirinil sulfuro (2-DPS) o metatiosulfonatos (MTS) que actúan como activantes y protectores permitiendo el intercambio disulfuro, ya que termodinámicamente se favorece la formación del disulfuro en la proteína (Chalker et al. 2009). Entre las ventajas de este método es la rápida y selectiva formación del disulfuro, elevados excesos del reactivo no son necesarios, y que incluso en algunos casos mediante control cinético se puede modificar selectivamente una cisteína sobre otra (Gamblin et al. 2004). Otra ventaja del enlace disulfuro, es que pese a ser un enlace covalente es posible revertirlo en presencia de agentes reductores como ditioneitol (DTT) o glutatión (GSSG), lo que le confiere una gran versatilidad y utilizándose para la liberación selectiva de fármacos (Wender et al. 2007). Además, recientemente se ha reportado la conversión del enlace disulfuro en un tioeter mediante una reacción de desulfurización, generando un enlace irreversible si se desea (Bernardes et al. 2008b).
- Conversión a deshidroalanina (DHA). La oxidación a deshidroalanina convierte a la cisteína en un poderoso y útil aceptor de Michael. El uso de la deshidroalanina como reactivo ha sido aplicado a un amplio rango de modificaciones postransduccionales (Bernardes et al. 2008a).



Esquema 3. Estrategias más comunes para la modificación química de cisteínas. 2,5-dibromohexanodiamida (2,5-DBB), Deshidroalanina (DHA), Tris(dimetilamino) fosfina ($\text{P(CH}_3)_3$)

3.3. *Modificación química de proteínas en fase sólida*

Durante los últimos años se han realizado diversos esfuerzos para mejorar o crear nuevas estrategias de modificación química, sin embargo existe un área poco explorada como es el desarrollo de estrategias de modificación química de proteínas en fase sólida.

La aplicación de métodos de modificación química sobre una proteína ligada a una matriz, ya sea de forma covalente o reversible, representa una importante simplificación en el protocolo de modificación (Fernandez-Lorente et al. 2008; Filice et al. 2011; Gutarra et al. 2011b; Huang et al. 2012).

Entre sus ventajas se destacan:

- Evitar interacciones no deseadas; como agregación u otras interacciones proteína-proteína. Además se minimizan la posible formación de agregados por el uso de agentes entrecruzantes.
- Evitar la inactivación y/o agregación bajo agresivas condiciones de modificación, la inmovilización al soporte puede promover una mayor estabilidad de la proteína frente a distintos agentes (por ej. solventes).
- Posibilidad de usar un exceso de reactivos, en general una simple filtración y lavado son suficientes para eliminar el exceso de reactivos.
- Fácil manejo y purificación: es posible eliminar laboriosos pasos intermedios de purificación (por ej. diálisis, cromatografía, etc). Además el proceso final de purificación es considerablemente simplificado o incluso no necesario si la proteína es usada en su forma inmovilizada.
- Rendimientos cuantitativos

Sin embargo, al momento de diseñar la estrategia de modificación existen algunos requerimientos que se deben considerar para lograr una exitosa modificación:

- Matriz o soporte inerte. El soporte a utilizar debe ser inerte en las condiciones de modificación.
- Tipo de unión al soporte. Según la aplicación deseada el uso de unión covalente o reversible al soporte. En este último caso, se considerar la estabilidad de la unión proteína-soporte en las condiciones de modificación.
- Buena congruencia geométrica entre el soporte y la zona de la proteína a modificar, para evitar impedimentos estéricos que disminuyan el rendimiento final de modificación.

De este modo la modificación química de enzimas previamente inmovilizadas con diversos agentes entrecruzantes o polímeros, ha permitido aumentar la estabilidad de diversas enzimas, tanto monoméricas como multiméricas (Abian et al. 2002; Bolivar et al. 2009). Asimismo el recubrimiento con polímeros ha permitido mejorar la actividad y selectividad de lipasas inmovilizadas (Cabrera et al. 2009; Cabrera et al. 2010). Otro

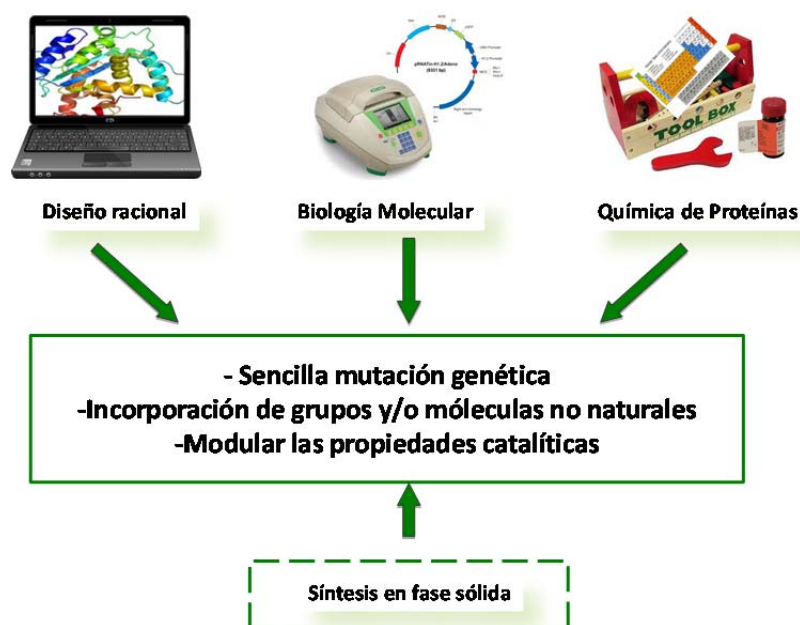
ejemplo, es la modificación química de las cadenas de los aminoácidos de la superficie de la proteína (carboxilos y/o aminos), alterando la distribución de cargas mejorando en las propiedades de las enzimas, e incluso obtener catalizadores con una elevada selectividad particularmente en lipasas. (Palomo et al. 2007).

De igual forma, la conjugación de distintas biomacromoléculas ha sido llevada a cabo mediante estrategias de modificación química en fase sólida, por ejemplo se puede mencionar la PEGilación (Huang et al. 2012), marcaje con fluorofóros (Filice et al. 2011) y conjugación proteína-proteína (Marciello et al. 2013).

Sin embargo, en la mayoría de los casos los biocatalizadores fueron modificados químicamente de forma no específica. Por lo tanto un enfoque global, que involucre un diseño racional para modificar específicamente un aminoácido a través de una aproximación multidisciplinar sería de gran validez, y es lo que propone en esta tesis doctoral.

Hoy en día se dispone de variedad de herramientas bioinformáticas que permiten un estudio detallado de la estructura de la proteína o en su defecto es posible crear de modelos homólogos, que ayudan a predecir los posibles cambios conformacionales o interacciones con otras moléculas. Sumado a esto, las herramientas de biología molecular cada vez son más accesibles, económicas y de fácil aplicación, y por supuesto no se debe olvidar las décadas de avance en química de proteínas.

Finalmente, si a todo esto se le añade los beneficios de la síntesis en fase sólida, es posible el desarrollo de estrategias de modificación química específica altamente efectivas y de fácil implementación.



Esquema 4. Esquema del desarrollo de estrategias de modificación química dirigida de proteínas en fase sólida

Objetivos

Objetivo General

Mediante el uso combinado de distintas herramientas biotecnológicas, como el diseño racional, estudios bioinformáticos, síntesis en fase sólida, mutagénesis dirigida y modificación química de proteínas es posible la mejora y/o incorporación de nuevas propiedades catalíticas a lipasas.

El objetivo general de esta tesis consiste en el desarrollo de estrategias de modificación química dirigida en fase sólida para la mejora en las propiedades catalíticas de lipasas previamente inmovilizadas.

Objetivos específicos:

A partir de lo anterior se desprenden distintos objetivos específicos:

- a. Desarrollar una estrategia de glicosilación química de lipasas inmovilizadas, mediante la incorporación selectiva de oligosacáridos en la superficie de la proteína
- b. Mediante el diseño racional y la introducción y ligación de 2 cisteínas en la zona del lid de la lipasa, promover cambios conformacionales para la mejora de las propiedades catalíticas.
- c. La creación de lipasas semisintéticas mediante la modificación dirigida de polímeros y péptidos en el lid de la lipasa para su uso en biotransformaciones.
- d. Rediseño del sitio activo de una lipasa mediante la incorporación de compuestos metanotiosulfonatos, para su aplicación en la resolución de esteres quirales.
- e. Creación de metaloproteínas artificiales, mediante el anclaje de catalizadores organometálicos en el sitio activo de lipasas.

Capítulo 1:

Glicosilación química en fase sólida de lipasas

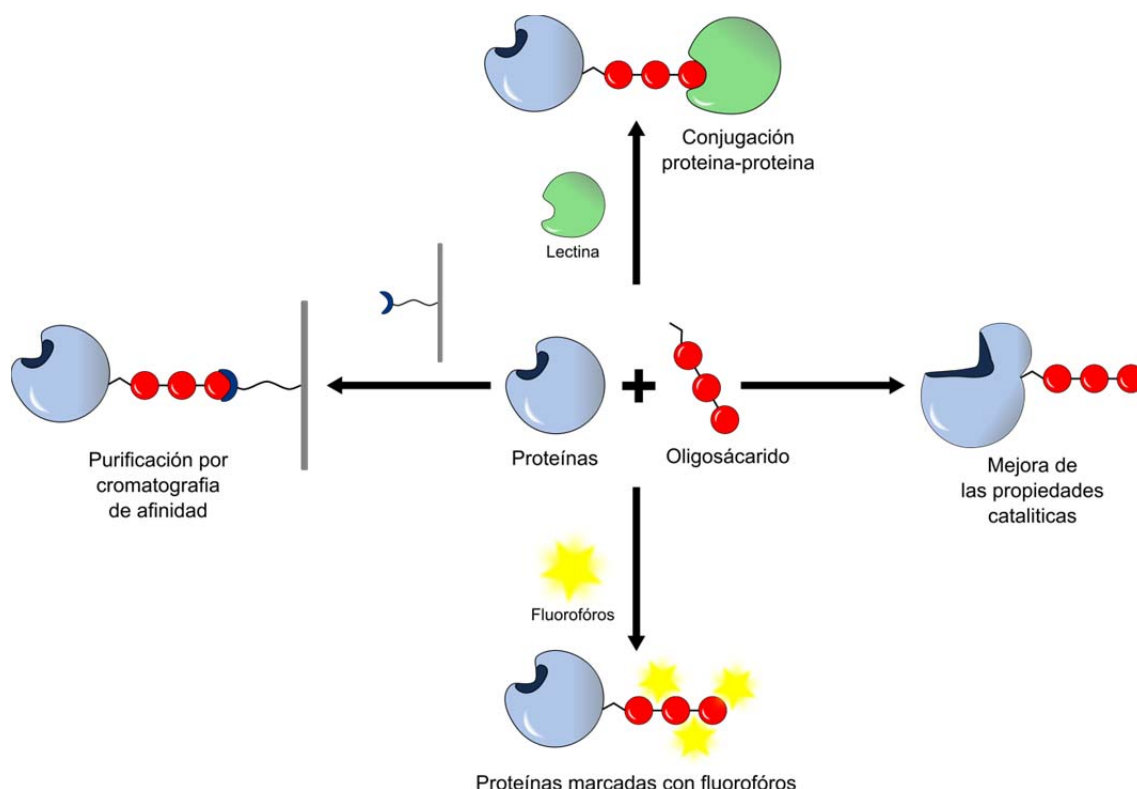
1. Introducción

La modificación química de proteínas es una poderosa herramienta para el estudio y modulación de la funciones de estas (Foley y Burkart 2007; Carrico 2008). Diversas estrategias han sido utilizadas para incorporación dirigida de diferentes moléculas, como carbohidratos, péptidos, nucleósidos, etc. Dentro de estas podemos mencionar reacciones catalizadas por metales (Dumas et al. 2013; Palomo 2013), reacciones de cicloadición (Palomo 2010; Filice et al. 2011), tiol-ligación (Hackenberger y Schwarzer 2008), etc.

Particularmente, la glicosilación de proteínas es uno de los procesos de modificación postransduccional más complejos. En humanos, más del 50% de las proteínas están glicosiladas, mientras en bacterias (como *E.coli*) toda la maquinaria bioquímica para la glicosilación es inexistente (Varki et al. 2009). A esto se suma la dificultad de aislar proteínas con modificaciones postransduccionales de forma pura y con rendimientos adecuados. Esto hace que el desarrollo de estrategias de modificación selectiva de proteínas, que mimeticen los procesos postransduccionales ocurridos *in vivo*, sea de vital importancia y uno de los grandes desafíos de la química de proteínas (Davis 2004; Gamblin et al. 2008).

La introducción de un oligosacárido representa una interesante ventaja para la química de proteínas, este tipo de modificación química podría ser utilizado para diversos usos, tales como: purificación selectiva (mediante cromatografía de afinidad a soportes activados con boronatos) (Gutarra et al. 2011a), bioconjugación específica con otras proteínas (lectinas, por ej.) (Leipold et al. 2009), diana para el marcaje con fluoróforos (Gao et al. 2006) o para la alteración de las propiedades catalíticas de las enzimas (Esquema 1.1).

Recientemente se ha reportado el uso de la glicosilación, como herramienta para la mejora de las propiedades catalíticas de enzimas, mejora en la estabilidad frente a diversos agente en peroxidasas (Asad et al. 2011) o mejora la estabilidad y catálisis en proteasas (Solá y Griebenow 2006). Pese a los avances, la incorporación química de polímeros y oligosacáridos para la mejora de las propiedades de enzimas no ha sido extensamente desarrollado (Gauthier y Klok 2010).



Esquema 1.1. Aplicaciones de la incorporación de oligosacáridos en proteínas

Por otra parte, la modificación de proteínas soportadas en superficies sólidas puede presentar todas las ventajas de la química en fase sólida: uso de exceso de oligosacáridos, rendimientos cuantitativos, fácil purificación y manejo, etc (Dax 2009).

A continuación se describirá la incorporación selectiva de polímeros de dextranos hechos a medida para la glicosilación específica de la lipasa de *C.antarctica* B (CALB). La modificación se realizó sobre la enzima previamente inmovilizada en octil-agarosa. Los nuevos catalizadores glicosilados se han caracterizados estructuralmente, mediante espectrometría de dicroísmo circular y fluorescencia, y sus propiedades catalíticas fueron evaluadas en la transesterificación de glicerina. Adicionalmente, el método de glicosilación química fue evaluado en otras lipasas, aplicándolas en la desimetrización asimétrica de un ester proquiral.

2. Objetivo

Desarrollar una estrategia de glicosilación química de lipasas inmovilizadas, mediante la incorporación selectiva de oligosacáridos en la superficie de la proteína.

Objetivos específicos:

A partir del objetivo general del capítulo, se desprenden los siguientes objetivos específicos:

- a. Desarrollo de una estrategia de modificación química selectiva para incorporación de dextranos en la superficie de la lipasa de *C.antarctica*.
- b. Caracterización estructural de los nuevos catalizadores químicamente glicosilados.
- c. Aplicación de los catalizadores químicamente glicosilados en biotransformaciones de interés en química fina.
- d. Expandir la estrategia de modificación sobre otras lipasas.

3. Materiales y Métodos

3.1. General

Lipasa de *C. antarctica* B (CALB), lipasa de *T. lanuginosus* (TLL) fueron suministradas por Novozymes (Dinamarca). Octil-agarosa 6BCL es proporcionado por GE Healthcare (Suecia). Lipasa de *C. cylindracea* (CCL), p-nitrofenol butirato (pNPB) (1), dietil fenilmalonato (2), metil butirato (3), dimetil fenilglutarico (4), dextrano (PM: 1500, 6000 Da), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), etilendiamina (EDA), borohidruro de sodio (NaBH_4) y peryodato de sodio (NaIO_4) fueron suministrados por Sigma. Glicerol (99,5%) fue proporcionado por Acros. Otros reactivos fueron de grado analítico.

3.2. Preparación de dextranos aldehídos (Dext-CHO)

A una solución acuosa de dextrano (50 mL, 33.33 mg/mL) se añadió 80 mg y 3 mg de peryodato de sodio (NaIO_4) a los dextrano 1500 Da y 6000 Da, respectivamente. Después de 1.5 h de oxidación a 25°C, el dextrano parcialmente oxidado fue extensivamente dializado frente a agua destilada.

3.3. Inmovilización de lipasas en Octil-agarosa.

A 1 g de octil-agarosa se añadió 10 mL de una solución enzimática (CALB, TLL o CCL) en tampón fosfato 10 mM pH 7.0, incubándola durante 3 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se filtró y lavó con abundante agua destilada. La concentración final de proteína (lipasa) fue de 5 mg/g soporte.

3.4. Aminación química en fase sólida de CALB.

La aminación química de CALB se realizó tal como se ha descrito anteriormente (Palomo et al. 2007). Brevemente, 1 g de CALB inmovilizada en octil-agarosa fue suspendida en 10 mL de una solución 1 M de EDA pH 4.75. Posteriormente se añadió 19.2 mg de EDC, ajustando el pH a 4.75. La preparación se incubó durante 2 h para posteriormente ser filtrada y lavada con abundante agua destilada.

3.5. Modificación de CALB con dextrano-CHO

Una solución de Dext-CHO (20 mL), en tampón fosfato 25 mM pH 7.5, fue añadido a 1 g de CALB inmovilizada en octil-agarosa. La solución se agitó suavemente durante 36 h. Posteriormente se añadió 20 mg de NaBH_4 , más otros 20 mg adicionales a los 15 minutos. Posteriormente el catalizador modificado fue filtrado y lavado con abundante agua. El rendimiento de modificación se analizó mediante SDS-PAGE.

Adicionalmente, se obtuvo la forma soluble de CALB modificado con dextranos. Para esto 1 g de la enzima modificada fue desorbida en 20 mL de tampón fosfato 10 mM con 0.5% de lauril sucrosa, para posteriormente ser dializada y concentrada con centricones Amicon Ultra de 10 kDa.

3.6. *Modificación de CALB aminada (CALBNH₂) con dextrano-CHO*

La modificación de CALBNH₂ se realizó de forma similar a lo descrito en el punto anterior. Una solución de Dext-CHO (20 mL), en tampón fosfato 25 mM pH 7.5, fue añadido a 1 g de CALBNH₂ inmovilizada en octil-agarosa. La solución se agitó suavemente durante 36h. Posteriormente se añadió 20 mg de NaBH₄, más otros 20 mg adicionales a los 15 minutos. Posteriormente el catalizador modificado fue filtrado y lavado con abundante agua. El rendimiento de modificación se analizó mediante SDS-PAGE.

Adicionalmente, se obtuvo la forma soluble de CALB modificado con dextranos. Para esto 1 g de la enzima modificada fue desorbida en 20 mL de tampón fosfato 10 mM con 0.5% de lauril sucrosa, para posteriormente ser extensivamente dializada y concentrada con centricones Amicon.

3.7. *Ensayo de actividad Enzimática (pNPB)*

El ensayo se llevó a cabo midiendo el aumento en el valor de absorbancia a 348 nm producido por la formación de p-nitrofenol en la hidrólisis de p-nitrofenol butirato (1) (pNPB) ($\epsilon=5150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) en 25 mM de tampón fosfato sódico a pH 7.0 y 25°C. Para iniciar la reacción, 0.05-0.2 mL de la solución o suspensión enzimática se añadió a 2.5 mL de 0.4 mM del sustrato. Una unidad internacional de actividad de pNPB se define como la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 1 μmol de pNPB por minuto (IU) bajo las condiciones descritas anteriormente.

3.8. *Ensayos de termoestabilidad de las preparaciones de CALB*

0.5 g de biocatalizador fue disuelto en tampón fosfato 25 mM pH 7.0, posteriormente incubado a 55°C. Se midió la actividad remanente a diferentes tiempos usando como sustrato pNPB, tal como se ha descrito previamente.

3.9. *Electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)*

Electroforesis de las distintas proteínas se realizó según lo descrito por (Laemmli 1970), utilizando un equipo Mini-Protean 3 de Bio-Rad y geles de poliacrilamida con de 12%. A las muestras proteicas, ya sea soluble (50 μL) o inmovilizada (50 mg), se adicionó tampón de ruptura y fueron hervidas durante 5 min. Posteriormente los sobrenadantes fueron inyectados en el gel. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie. Se utilizaron marcadores de bajo peso molecular suministrados por GE Healthcare (14.4 – 97.0 kDa).

3.10. *Espectrometría de Dicroísmo Circular (DC)*

Los espectros de DC de los distintos catalizadores fueron realizados por la Dra. Olga Abian del Instituto de Biocomputación y Física de Sistemas Complejos (BIFI), Zaragoza, España. Los espectro de DC de CALB soluble, glicosilada y sin glicosilar, fueron registrados en espectropolarímetro Chirasca (Applied

Photophysics) a 25°C. El espectro UV-lejano fue medido entre las longitudes de onda 290-250 nm en una cubeta de 1 mm de paso, con 2 mM de la solución de proteína en tampón PBS pH 7.2.

3.11. *Espectrometría de Fluorescencia*

Los espectros de fluorescencia de los distintos catalizadores fueron realizados por la Dra. Olga Abian del Instituto de Biocomputación y Física de Sistemas Complejos (BIFI), Zaragoza, España. Las medidas fueron realizadas en un espectrómetro de fluorescencia Varian CArY Eclipse (Agilent Technologies) monitoreando la fluorescencia intrínseca de los residuos triptófano de los distintas lipasas, tanto solubles como inmovilizadas, usando como longitud de excitación 280 nm, con bando de anchas de excitación y emisión de 5 nm, registrando el espectro de fluorescencia entre 300 y 400 nm. Todas las mediciones se realizaron en tampón fosfato 10 mM pH 7.0 con y sin la presencia de 0.1% de TritónX-100.

3.12. *Transesterificación enzimática de glicerol con dietetil fenilmalonato (2)*

El sustrato dietil fenilmalonato (2) (12 mg) fue disuelto en 1 mL de tampón fosfato 100 mM, para posteriormente añadir 9 mL de glicerol (para obtener una concentración final de 5 mM de (2)). A esta solución se añadió 0.5 g de los distintos catalizadores inmovilizados, y se mantuvo en vigorosa agitación (1000 rpm), a 37°C. Se tomaron distintas muestras de la suspensión, las cuales se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante resultante se diluyó 5 veces con la fase móvil para ser analizado por HPLC. La conversión de la reacción se analizó mediante HPLC en fase reversa (Spectra Physic SP 100 acoplado con un detector UV Spectra Physic SP 8450). Se empleó una columna Kromasil C8 (25x0.4 cm) suministrada por Análisis Vínicos. Como fase móvil se utilizó una mezcla isocrática de 40% (v/v) acetonitrilo en 10 mM tampón amonio fosfato a un pH final de 3.0 con un flujo de 1.0 mL/min. La detección UV se realizó a 230 nm. Una unidad internacional de actividad se definió como la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 1 μ mol del sustrato (2) por minuto (IU) bajo las condiciones descritas anteriormente.

3.13. *Transesterificación enzimática de glicerol con metil butirato (2)*

El sustrato metil butirato (3) (20 mg) fue disuelto en 1 mL de tampón fosfato 100 mM, para posteriormente añadir 9 mL de glicerol (para obtener una concentración final de 20 mM de (3)). A esta solución se añadió 0.5 g de los distintos catalizadores inmovilizados, y se mantuvo en vigorosa agitación (1000 rpm), a 25°C. Se tomaron distintas muestras de la suspensión, las cuales se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante resultante se diluyó 5 veces con la fase móvil para ser analizado por HPLC. La conversión de la reacción se analizó mediante HPLC en fase reversa (Spectra Physic SP 100 acoplado con un detector UV Spectra Physic SP 8450). Se empleó una columna Kromasil C8 (25x0.4 cm) suministrada por Análisis Vínicos. Como fase móvil se utilizó una mezcla isocrática de 30% (v/v) acetonitrilo en 10 mM tampón amonio fosfato a un pH final de 3.0 con un flujo de 1.0 mL/min. La detección UV se realizó a 230 nm. Una unidad internacional de actividad se definió como la cantidad de

enzima necesaria para hidrolizar 1 μmol del sustrato (3) por minuto (IU) bajo las condiciones descritas anteriormente.

3.14. Hidrolisis enzimática de dimetil fenilglutarato (4)

El sustrato 4 (0.5 mM) fue disuelto en una mezcla de 5% (v/v) de acetonitrilo en 10 mM de tampón fosfato sódico pH 7.0. Posteriormente a 0.25 g del catalizador inmovilizado se añadió 5 mL de la solución del sustrato, manteniéndolas a 25°C y agitación constante. Se analizó la conversión mediante HPLC en fase reversa (Spectra Physic SP 100 acoplado con un detector UV Spectra Physic SP 8450). Se empleó una columna Kromasil C8 (25x0.4 cm) suministrada por Análisis Vínicos. Como fase móvil se utilizó una mezcla isocrática de 35% (v/v) de acetonitrilo en 10 mM tampón amonio fosfato a un pH final de 3.0 con un flujo de 1.5 mL/min. La detección UV se realizó a 225 nm. Una unidad internacional de actividad se definió como la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 1 μmol del sustrato (4) por minuto (IU) bajo las condiciones descritas anteriormente.

Determinación del exceso enantiomérico: El exceso enantiomérico del monoéster 4a fue analizado mediante HPLC quiral en fase reversa a 15-20% de conversión. Se empleó una columna Chiracel OD-R, utilizando como fase móvil una mezcla isocrática de 20% de acetonitrilo en 10 mM tampón amonio fosfato a un pH final de 3.0 a un flujo de 0.5 mL/min. La detección UV se realizó a 210 nm. Los tiempos de retención fueron 45.2 y 48.4 minutos para los enantiómeros S y R respectivamente.

4. Resultados

4.1. Preparación de los oligosacáridos y glicosilación química de lipasas.

Se prepararon distintos dextranos-aldehídos (Dext-CHO) de diferente tamaño y con un muy bajo grado de oxidación (Fuentes et al. 2004). Esto se realizó mediante la oxidación con NaIO_4 , ya que este oxida específicamente los hidroxilos en las posiciones C2, C3 de la glucosa (Novikova et al. 2002), de esta forma cada molécula de dextrano es funcionalizada idealmente con dos aldehídos (Figura 1.1.A).

Estos polímeros fueron conjugados con la lipasa de *C.antarctica B* (CALB), previamente inmovilizada en octil-agarosa mediante animación reductiva sobre los grupos aminos de la proteína. Como primer punto se estudió el uso de polímeros de distinto tamaño (1500 y 6000 Da), realizando la modificación a un pH de 7.5 para incorporar el polímero selectivamente en el N-terminal de la proteína (Figura 1.1.B). Como se observa en la electroforesis (Figura 1.2.A), se obtiene un elevado rendimiento de modificación (sobre un 95%).

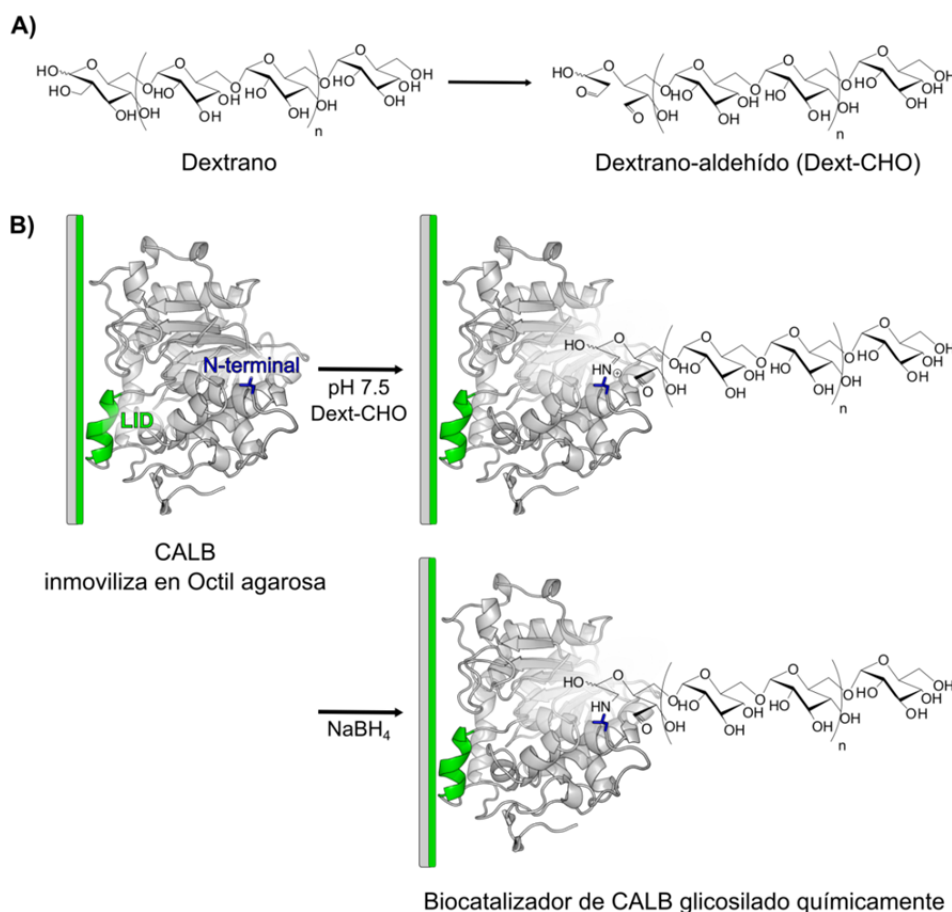


Figura 1.1. Esquema general de la glicosilación en fase solida de CALB. **A)** Preparación de los dextranos-aldehídos (Dext-CHO); **B)** Incorporación selectiva del oligosacárido en el N-terminal de CALB previamente inmovilizada.

De igual manera se evaluó el efecto de la modificación sobre una lipasa animada químicamente, donde los grupos carboxilos de Asp y Glu son convertidos a aminos primarios (Palomo et al. 2007; Fernandez-Lorente et al. 2008). Se estudió la modificación a distintos pH's: 7.5, 9.0 y 10.0 con el objetivo fue ver la posibilidad de modificar selectivamente los distintos grupos aminos presentes en la proteína. Como se observa en la Figura 1.2.B, solo a pH 7.5 se logra una modificación específica, ya que a pH 9.0 y pH 10.0 se observaron conjugados de alto peso molecular (entre 75-95 Da). Estos conjugados probablemente corresponden al entrecruzamiento entre 2 moléculas de CALB más la incorporación de varias moléculas de dextrano por molécula de lipasa. Debido a esto se descartaron estos conjugados, y a continuación se continuó con la caracterización de los catalizadores glicosilados a pH 7.5.

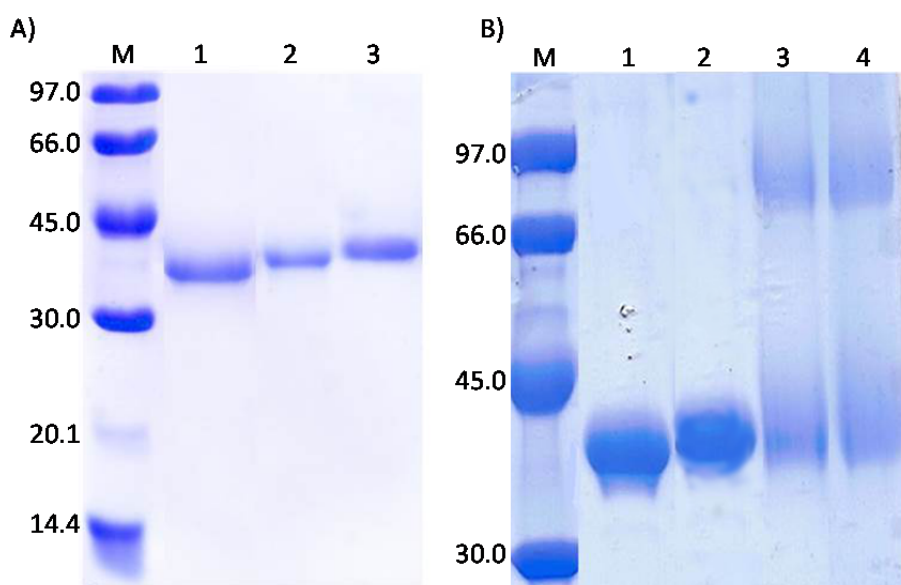


Figura 1.2. Electroforesis de CALB glicosilada químicamente. **A)** Modificación a pH 7.5. M: Marcadores de peso molecular; L1: CALB; L2: CALB-Dext1500; L3: CALB-Dext6000. **B)** Modificación a distintos pH's: M: Marcadores de peso molecular; L1: CALBNH₂; L2: CALBNH₂-Dext1500 pH 7.5; L3: CALBNH₂-Dext1500 pH 9.0; L4: CALBNH₂-Dext1500 pH 10.

4.2. Caracterización estructural de la CALB glicosilada químicamente.

A continuación mediante experimentos de dicroísmo circular (DC) y fluorescencia de proteínas se estudiaron los posibles cambios en la estructura de CALB después de la glicosilación química.

En la Figura 1.3.A se muestra el espectro de DC de CALB antes y después de la glicosilación química. Se puede observar una disminución del contenido en α -hélices en la estructura secundaria de CALB después de la modificación con Dext1500 (Figura 1.3.A). Así mismo, para el mismo catalizador se observa un desplazamiento de 11 nm en la λ_{max} hacia longitudes de onda menores (Figura 1.3.C). Esto podría indicar que la incorporación del polímero Dext1500 en la proteína estuviese favoreciendo una conformación más abierta de la lipasa.

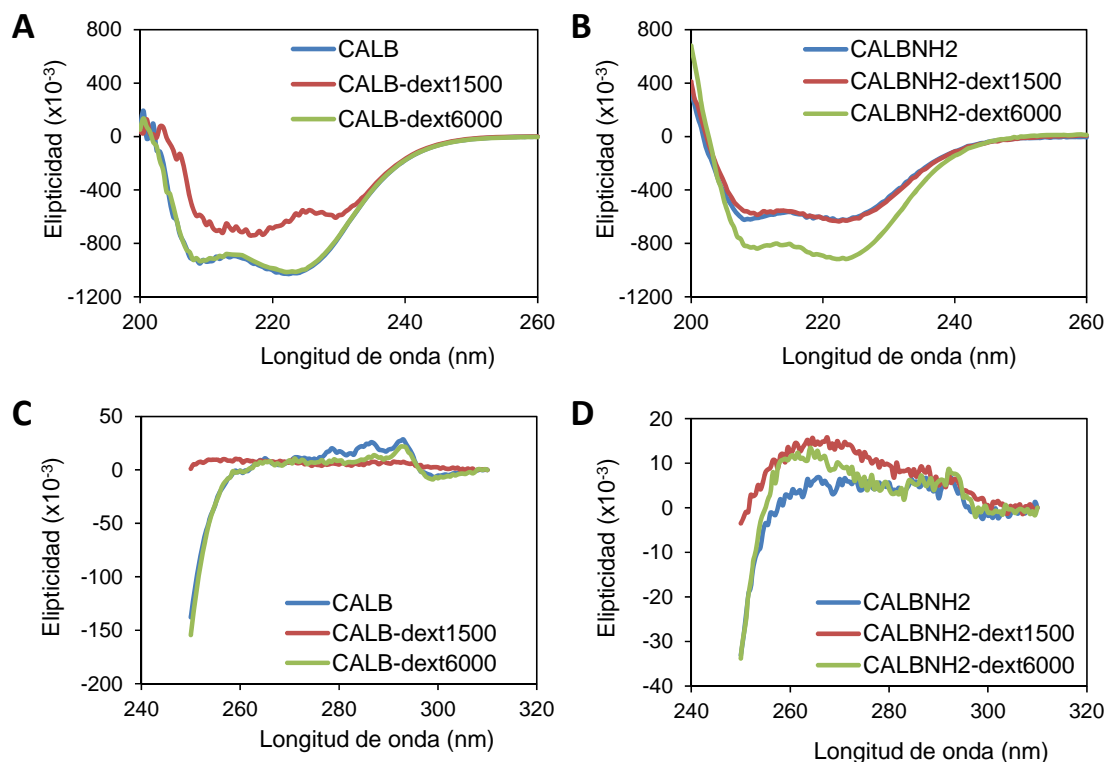


Figura 1.3. Caracterización estructural de los catalizadores glicosilados de CALB. Espectros de DC de: **A)** CALB y **B)** CALBNH₂. Espectros de fluorescencia de: **C)** CALB y **D)** CALBNH₂.

En el caso de CALB-Dext6000, tanto el espectro de DC como el de fluorescencia son bastante similares a los de la proteína sin modificar (Figura 1.3. A y C), por lo cual se presume que la incorporación de este polímero no promueve un cambio significativo en la estructura de la proteína.

Analizando los espectros de DC de las lipasas aminada (CALBNH₂) y posteriormente modificada con Dext1500 (CALBNH₂-Dext1500) se observó bastante similitud entre ambos. Por el contrario la modificación con Dext6000 promovió un incremento en las α -hélices en la estructura secundaria (Figura 1.3.B). Al analizar los espectros de fluorescencia se produce un pequeño cambio de 5 nm en la λ_{max} , hacia longitudes de onda mayores, lo que pudiese sugerir una estructura levemente más cerrada (Figura 1.3.D).

Por lo tanto, los resultados parecen sugerir que la incorporación de una molécula de dextrano en el amino terminal de la proteína inmovilizada promueve cambios en su estructura secundaria y terciaria. Estos cambios estructurales son significativos en el caso de CALB-Dext1500, y los resultados sugirieron que se promueve una forma más abierta de la lipasa.

4.3. Efecto sobre la actividad y la estabilidad de los catalizadores de CALB

A continuación se estudió el efecto de la glicosilación química sobre las propiedades catalíticas de CALB y sus derivados.

Como primer punto se analizó la actividad específica frente a pNPB (1) de CALB y sus derivados glicosilados. Como se observa en la Figura 1.4.A, en todos los casos la incorporación del polímero produce un catalizador más activo. La combinación de aminación química y una posterior incorporación de Dext1500 promovió un incremento de la actividad de CALB en más de 2.5 veces.

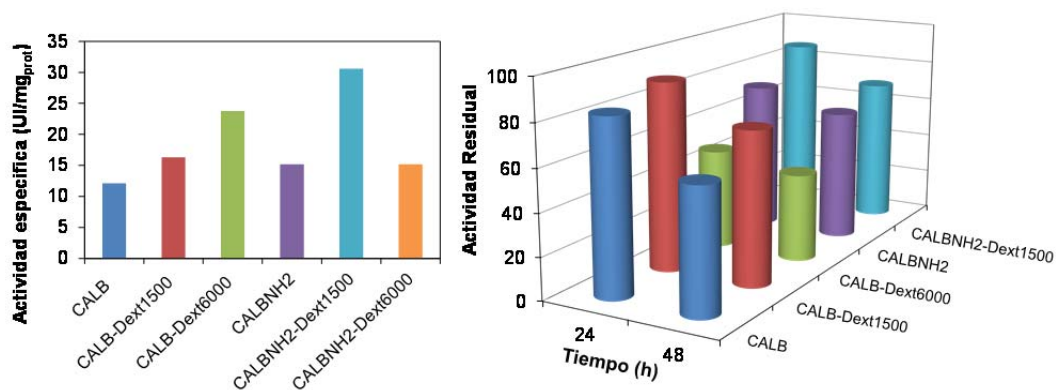


Figura 1.4. Efecto de la glicosilación química sobre las propiedades catalíticas de CAL y sus derivados. **A)** Actividad específica y **B)** Estabilidad térmica a 55°C.

Adicionalmente, se analizó la estabilidad térmica de los distintos catalizadores de CALB. Se puede observar en la Figura 1.4.B, que la modificación con Dext1500 mejoró la estabilidad de CALB, la cual conservó un 72% de la actividad inicial después de 48 horas de incubación a 55°C, en comparación al 59% de la enzima sin modificar. Por el contrario la modificación con un polímero de mayor tamaño disminuyó su estabilidad, reteniendo solo un 42% de la actividad inicial después de 48 horas a las condiciones previamente señaladas. De igual forma CALBNH₂ ve mejorada su estabilidad después de la incorporación de Dext1500, reteniendo un 70% de su actividad inicial.

Observando las mejoras en las propiedades catalíticas debidas a la glicosilación, a continuación se estudió la aplicación de los nuevos catalizadores en reacciones de importancia biotecnológica.

4.4. *Síntesis cinéticamente controlada de ésteres de glicerina, catalizada por derivados glicosilados de CALB*

Los catalizadores inmovilizados de CALB glicosilados fueron aplicados en la síntesis de ésteres de glicerina. En un comienzo se estudió la transesterificación utilizando dietilfenilmalonato (2) como donador de acilo (Tabla 1.1). En este caso se observaron muy bajos rendimientos de síntesis para todos los catalizadores estudiados, produciéndose monoetilfenilmalonato (2b) como principal producto. Además no se observaron diferencias en la actividad entre los catalizadores.

Tabla 1.1. Transesterificación de dietilfenilmalonato (**2**) con glicerol catalizado por diferentes catalizadores de CALB.

Catalizador	Tiempo [h]	Actividad ^a	Conversión [%]	Síntesis 2a ^b	Hidrólisis 2b ^d
CALB	175	0.026	51	6	46
CALB-Dext1500	175	0.028	51	6	45
CALB-Dext6000	175	0.026	45	5	40
CALBNH ₂	175	0.028	45	4	41
CALBNH ₂ -Dext1500	175	0.026	48	4	44

^a Actividad específica definida como $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}_{\text{prot}}$ ^b Rendimiento de monogliceril ester (**2a**)^c Producción de monometil fenil malonato (**2b**)

A continuación y a partir de los resultados anteriores, se estudió la transesterificación de glicerina utilizando un donador de acilo más pequeño, como el metilbutirato (**3**). En la Tabla 1.2 se puede observar que CALB sintetizó el 2-gliceril-butirato (**3a**) con un 57% de rendimiento al 100% de conversión, con una actividad específica de 5.5UI/mg_{prot}. La modificación con Dext1500 y Dext6000 produjo un incremento en la actividad cercano a 2 veces. Por su parte el catalizador aminado químicamente, CALBNH₂, se mostró 2 veces más activo que CALB, sin embargo la glicosilación no provocó ningún cambio, tanto en la actividad como en el rendimiento final de síntesis.

Tabla 1.2. Transesterificación de metilbutirato (**3**) con glicerol catalizado por diferentes catalizadores de CALB.

Catalizador	Tiempo [min]	Actividad ^a	Conversión [%]	Síntesis 3a ^b	Hidrólisis 3b ^d
CALB	30	5.5	100	57	43
CALB-Dext1500	30	9.7	100	80	20
CALB-Dext6000	30	9.0	100	58	42
CALBNH ₂	30	11.5	100	59	41
CALBNH ₂ -Dext1500	30	11.3	100	58	42

^a Actividad específica definida como $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}_{\text{prot}}$ ^b Rendimiento de monogliceril ester (**3a**)^c Producción de ácido butírico (**3b**)

El resultado más destacado es el incremento del rendimiento de síntesis, sobre un 80%, cuando CALB es glicosilado con Dext1500. Otras modificaciones no modificaron el rendimiento final del producto (3a). En la Figura 1.5 se muestra el curso de la reacción de síntesis de (3a) catalizada por CALB y CALB-Dext1500.

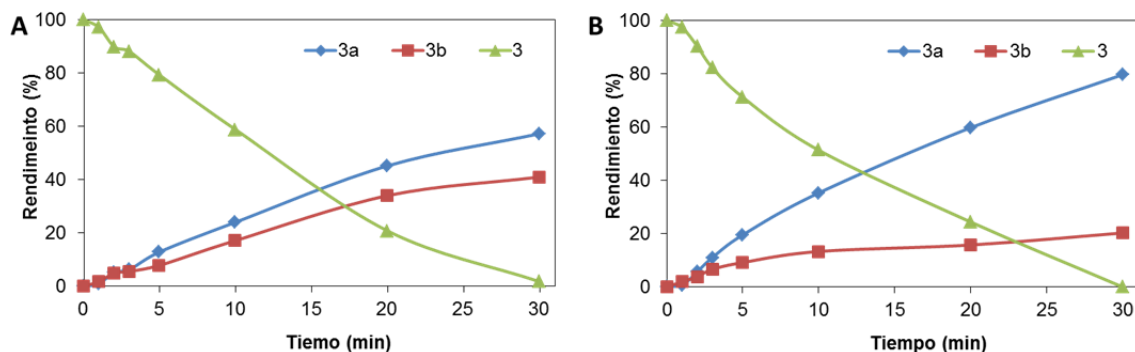


Figura 1.5. Transesterificación de glicerina con metil butirato catalizada por: A) CALB; B) CALB-Dext1500.

Por lo tanto, fue posible generar un biocatalizador glicosilado CALB-Dext1500 altamente activo y con excelentes rendimientos en la síntesis de 2-gliceril-butirato (3a) de modo de aprovechar un subproducto de la industria de biocombustibles para la generación de intermedios y “building blocks” en la síntesis de diversos productos de interés en la industria farmacéutica y de alimentos.

4.5. Aplicación a otras enzimas y resolución de esteres quirales.

Adicionalmente se estudió la glicosilación química sobre otras lipasas. Se seleccionaron las lipasas de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) y *Candida cylindracea* (CCL).

Ambas lipasas, previamente inmovilizadas en octil-agarosa, fueron modificadas con Dext1500 y Dext6000 como se ha descrito previamente. El rendimiento de modificación fue de más del 95%, analizado mediante SDS-PAGE.

Ambas lipasas y sus respectivos variantes glicosilados fueron evaluados como catalizadores en la hidrólisis asimétrica del dimetilfenilglutarato (4). Los resultados se muestran en la Tabla 1.3. Se puede observar que para la lipasa TLL la glicosilación química no mejoró las propiedades de la enzima. De hecho, la lipasa TLL mostró una disminución tanto en su actividad específica como en su enantioselectividad, tras la incorporación del polímero. La lipasa CCL mostró un notable incremento en la enantioselectividad tras la glicosilación, alrededor de 10 veces dependiendo del tamaño del polímero incorporado. El mejor resultado se obtiene con CLL-Dext1500, produciéndose un incremento en la enantioselectividad, desde un e.e. de 8.6% con la enzima nativa hasta e.e. de 84.8% con la enzima glicosilada. Sin embargo, la glicosilación provocó una fuerte caída en la actividad en los catalizadores estudiados.

Tabla 1.3. Hidrolisis asimétrica de dimetilfenil glutarato (**4**) catalizada por lipasas químicamente glicosiladas.

4 **(R)-4a**

Catalizador	Actividad ^{a, b}	e.e. ^c [%]
TLL	0.36	10.8
TLL-Dext1500	0.10	0.6
TLL-Dext6000	0.14	4.4
CCL	1.20	8.6
CCL-Dext1500	0.17	84.8
CCL-Dext6000	0.22	79.2

^a Actividad específica definida como $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}_{\text{prot}}$ ^{b, c} Determinado entre 10-15% de conversión.

Mediante una simple modificación química se ha diseñado para la creación de nuevos biocatalizadores a partir de distintas lipasas, incrementando en 10 veces el e.e. de CCL después de la glicosilación química.

5. Conclusiones

La lipasa de *C. antarctica* fue glicosilada químicamente en fase sólida, a través de una estrategia de incorporación de dextranos-aldehídos en el N-terminal mediante un procesos de aminación reductiva de forma cuantitativa.

- a. A través de espectrometría de dicroísmo circular y fluorescencia se observó que la glicosilación química de la lipasa de *C. antarctica* provoca cambios en la estructura secundaria y terciaria.
- b. Las propiedades catalíticas fueron mejoradas mediante esta estrategia de modificación, promoviendo una mayor estabilidad, actividad y selectividad.
- c. Los catalizadores glicosilados fueron aplicados con éxito en la síntesis cinéticamente controlada de esteres de glicerina, mostrando una mejor en la actividad específica.
- d. El glicoconjugado CALB-Dext1500 mostró una elevada actividad de síntesis en la transesterificación de glicerina. La lipasa glicosilada fue capaz de sintetizar (3a) con un 80% de rendimiento al 100% de conversión, un importante incremento en comparación a la lipasa sin modificar (57%)
- e. La estrategia de modificación fue aplicada con éxito a otras lipasas. En el caso de la lipasa de *C. cylindracea* es posible mejorar su enantioselectividad en la hidrolisis asimétrica de (4), aumentando el e.e. desde un 8.6% hasta un 84% tras la incorporación del polímero Dext1500.

Capítulo 2:

Estabilización de la conformación abierta de la lipasa mediante la ligación de 2 cisteínas

1. Introducción

Una de las herramientas más utilizadas en el diseño racional de proteínas es la introducción de enlaces disulfuros mediante mutagénesis dirigida. Los enlaces disulfuros estabilizan la estructura de las proteínas debido a la disminución de la entropía en su estado desnaturalizado (Woycechowsky y Raines 2000). Diversas enzimas han sido estabilizadas mediante el uso de esta estrategia (Li et al. 2005), como por ejemplo T4 lisozima (Matsumura y Matthews 1989), subtilisina (Wells y Powers 1986), ribonucleasas (Kanaya et al. 1991), xilanasa (Turunen et al. 2001) y lipasas (Yamaguchi et al. 1996; Han et al. 2009; Le et al. 2012; Yu et al. 2012). Sin embargo, existen casos donde la introducción de un enlace disulfuro puede conllevar efectos negativos sobre la estabilidad de la proteína (Betz et al. 1996).

Promover una mayor estabilidad en la proteína no es la única función de los enlaces disulfuros en sistemas biológicos, estos también tienen una importancia fundamental en el correcto plegamiento de las proteínas (Kim y Baldwin 1990). Además, la fácil interconversión de la cisteína entre diversos estados de oxidación, incluyendo el enlace disulfuro (Figura 2.1), la hace esencial en la regulación redox de la célula (Jacob et al. 2003). La variedad de diferentes especies en la que se puede encontrar la cisteína, alrededor de 10 (Figura 2.1), le confiere propiedades químicas y bioquímicas perfectas para una variedad de modificaciones postransduccionales (Jacob et al. 2003).

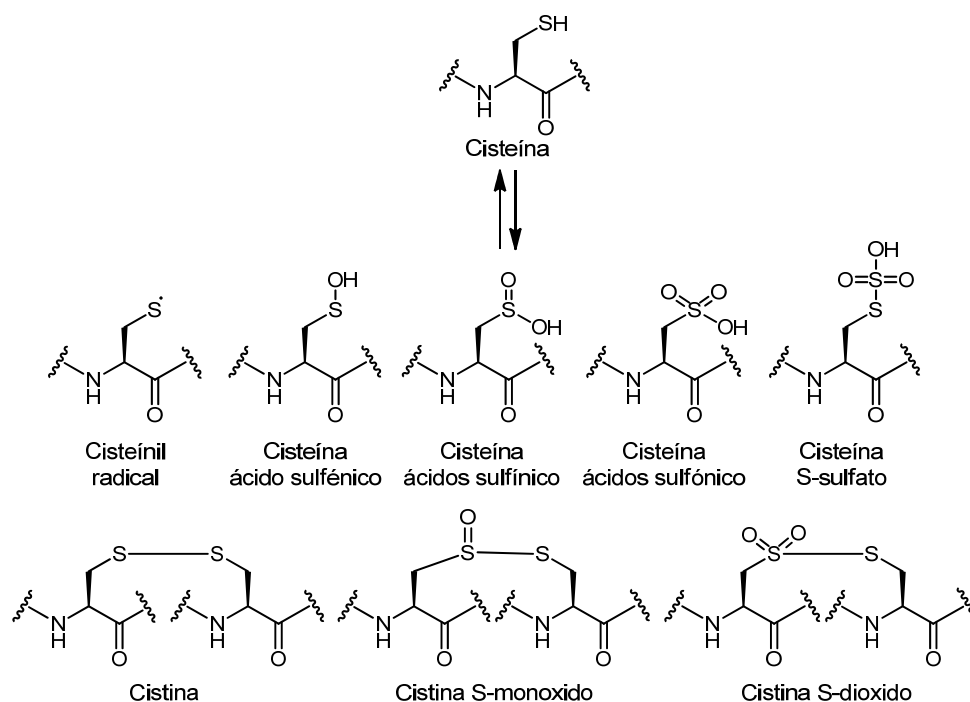


Figura 2.1. Diferentes estadios de oxidación de cisteína.

De todas las posibles modificaciones de la cisteína, la formación de disulfuros es la más común. *In vivo* existe un complejo mecanismo para la formación de disulfuros, que involucra varias proteínas tanto en la oxidación de tioles como en la isomerización de enlaces disulfuros no nativos (Woycechowsky y Raines

2000). Los enlaces disulfuros también pueden generarse *in vitro*, tanto en el re/plegamiento (Kim y Baldwin 1990) de proteínas como en la conjugación con moléculas tioladas, siendo uno de los métodos más sencillos la oxidación mediante aireación (Andersson 1969). Las desventajas de este método son los largos tiempos de reacción y el control de la distribución de los productos (Andersson 1969; Chalker et al. 2009). Para solucionar estas deficiencias se han desarrollado varios protocolos alternativos de conjugación, como por ejemplo la activación de la cisteína con DTNB o 2-DPS para el posterior intercambio disulfuro con la molécula de interés (Hermanson 2008).

En el caso de la formación de puentes disulfuro dentro de la misma cadena polipeptídica, se ha descrito que el uso de aditivos favorecen la formación de puentes disulfuro (Clark 2001), pero esto depende de la correcta disposición y geometría de las cisteínas involucradas en el proceso (Hazes y Dijkstra 1988) (Figura 2.2). Los enlaces disulfuros se ajustan a las estrictas restricciones geométricas, y considerar solo la distancia entre un par de aminoácidos no es muy eficaz (Dombkowski 2003). Sin embargo, se han desarrollado algunas herramientas bioinformáticas para ayudar en el diseño de los disulfuros (Hazes y Dijkstra 1988; Dombkowski 2003; Thangudu et al. 2005).

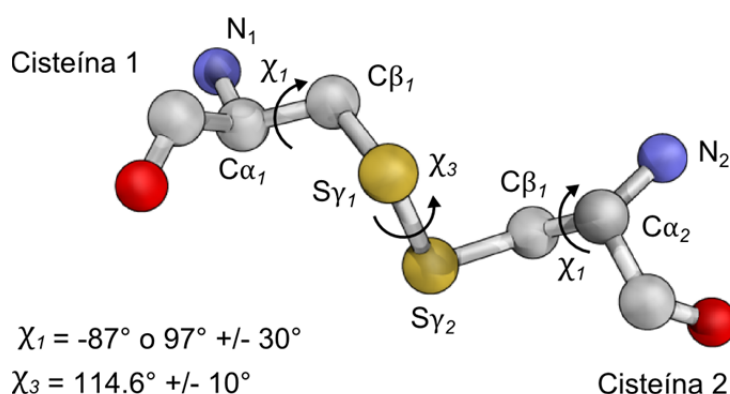


Figura 2.2. Geometría de un puente disulfuro.

El mecanismo propuesto para la formación del disulfuro se muestra en la Figura 2.3. El grupo sulfhídrido de una de las cisteínas es oxidado a ácido sulfénico por acción del oxígeno (u otro agente oxidante, por ej. H_2O_2). Posteriormente, el ácido sulfénico puede reaccionar con un equivalente de un compuesto tiolado u otra cisteína, generando el enlace disulfuro. Como se ha mencionado, mediante esta estrategia no es posible controlar la distribución de los productos de la oxidación, por lo cual es posible que ambas cisteínas se oxiden a ácido sulfénico (o incluso otros productos de oxidación, ver Figura 2.1), siendo imposible la formación del enlace disulfuro.

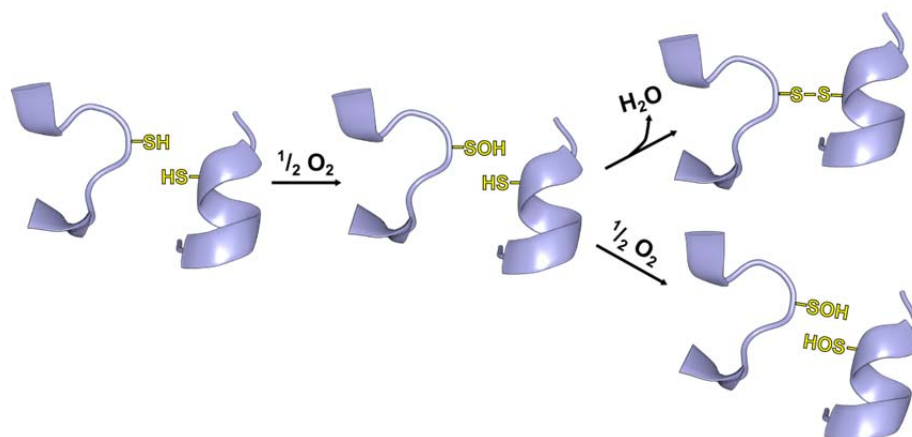


Figura 2.3. Mecanismo de formación de enlaces disulfuro *in vitro*.

Otra característica muy importante del enlace disulfuro, es que es reversible en ambientes reductivos. Dependiendo del caso, esta característica puede representar una gran ventaja, por ejemplo en la liberación selectiva de algún compuesto (Wender et al. 2007). Sin embargo, cuando este no es el propósito de la modificación puede resultar en un inconveniente. Una solución a este problema, es transformación del enlace disulfuro en un tioeter, mediante una reacción de desulfurización (Bernardes et al. 2008b). Mediante el uso de fosfinas orgánicas, como PBU_3 , $\text{P}(\text{NMe}_2)_3$ o $\text{P}(\text{NMe}_2)_3$, es posible transformar el enlace disulfuro a tioeter (Bernardes et al. 2008b). Recientemente, este método ha sido aplicado con éxito en la preparación de diversos glicoconjugados (Bernardes et al. 2008b) y conjugados lipasa-péptidos, que se desarrollara en el capítulo 3 de esta tesis (Romero et al. 2012).

Como se ha mencionado previamente, las lipasas presentan un mecanismo catalítico muy complejo, que envuelve grandes cambios conformacionales en su estructura, los cuales están modulados por el lid (Verger 1997). Además de los aspectos estructurales donde está involucrado el lid, este tiene un papel crucial en las propiedades catalíticas de las lipasas. Considerando los cambios conformacionales durante la activación interfacial de las lipasas, es posible modificar las propiedades catalíticas de la enzima modulando el equilibrio entre las formas cerradas y abiertas (Palomo et al. 2002a; Palomo 2008). Basándose en lo anterior, en el presente capítulo se propone una estrategia de modificación química para estabilizar la conformación abierta de la lipasa *Geobacillus thermocatenulatus* (BTL) previamente inmovilizada, mediante la ligación de dos cisteínas introducidas genéticamente en el área del lid de la lipasa y evaluar su efecto no solo en estabilidad sino también en su actividad y enantioselectividad.

2. Objetivo general

En este capítulo se propone mediante el diseño racional y ligación de 2 cisteínas en la zona del lid de la lipasa de *G. thermocatenulatus*, para promover cambios conformacionales para mejorar las propiedades catalíticas.

Objetivos específicos

- a. A partir de un estudio bioinformático basado en las estructuras cristalizadas de las conformaciones abierta y cerrada de BTL, diseñar un doble mutante que permita la ligación de dos cisteínas en la zona del lid.
- b. Desarrollar una estrategia de modificación para ligar 2 cisteínas introducidas en la zona del lid.
- c. Caracterizar estructuralmente y estudiar las propiedades catalíticas del nuevo catalizador de BTL.

3. Materiales y Métodos

3.1. Reactivos

Octil-agarosa 6BCL y BrCN-agarosa 4BCL es proporcionado por GE Healthcare (Suecia). Ditiotreitól (DTT), glutatión (GSSG), dietil-p-nitrofenilfosfato (D-pNP), Tris(dimetilamino) fosfina (HMPT), hidrocloreuro de guanidina (GndCl), p-nitrofenol acetato, p-nitrofenol butirato (pNPB) (1), p-nitrofenol octanoato; p-nitrofenol docanoato; p-nitrofenol palmitato, dimetilfenilglutarico (4), feniletil acetato (5) y etil-2-hidroxi-4-fenilbutirato (6) fueron suministrados por Sigma. El ácido (\pm)-2-O-butil-2-fenilacético (7) fue sintetizado como previamente ha sido descrito (Palomo et al. 2003b). Otros reactivos y solventes fueron de grado analítico.

3.2. Mutagénesis dirigida de BTL

Todos los experimentos de mutagénesis dirigida fueron realizados por la Dra. Blanca de las Rivas del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN), Madrid, España. Brevemente, para introducir el cambio de amino ácido, el correspondiente par de primers fueron utilizados como primer homólogos en la reacción de PCR usando un plásmido específico como templado y Prime Start HS Takara DNA polimerasa. El producto de la PCR fue digerido con endonucleasa DpnI, que restringe exclusivamente ADN metilado (Schmidt-Dannert et al. 1996). Células de *E.coli* DH10B fueron transformadas directamente con el producto de digestión. El plásmido con BTL mutado fue identificado mediante secuencialización y posteriormente transformado en células de *E.coli* BL21 (DE3) para expresar las correspondientes proteínas. Primero se creó el mutante BTL-C65S y el plásmido resultante se utilizó como templado para crear el doble mutante BTL-C65S/C296S. Este plásmido fue utilizado como templado para construir las mutaciones adicionales usando diferentes primers mutagénicos (Tabla 2.1).

3.3. Clonaje, expresión y purificación.

Todos los experimentos de clonaje y expresión fueron realizados por la Dra. Blanca de las Rivas del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN), Madrid, España. Brevemente, el gen correspondiente a la lipasa de *G. thermocatenolatus* (BTL) fue clonado en el vector de expresión pT1 como se ha descrito previamente (Schmidt-Dannert et al. 1996; Godoy et al. 2011b). Las células de *E. coli* BL21(DE3) conteniendo el plásmido pT1BTL2 fueron cultivadas en medio LB a 30°C, la sobreexpresión de la proteína se llevó a cabo incrementando la temperatura a 42°C por 20 h. Posteriormente el cultivo se centrifugo a 6000 g durante 15 minutos a 4°C. El pellet obtenido de cada litro de cultivo, se resuspendió en 15 mM de Tampón fosfato 10 mM pH 7.0 con benzamidina 3 mM. La suspensión se rompió mediante sonicación durante 15 minutos (intervalos de 10 segundos) a 4°C. El lisado resultante se centrifugo a 15000 g durante 15 minutos a 4°C, se descarta el pellet.

La enzima fue purificada mediante adsorción interfacial a Octil-agarosa como previamente ha sido descrito (Palomo et al. 2003a). Brevemente, 1 mL del extracto crudo de BTL2 se diluyó 20 veces en tampón fosfato 5 mM pH 7.0 y se le agregó 1 g de Octil-agarosa incubándolo por 3 h para después filtrar y lavar con abundante agua. Posteriormente la lipasa fue desorbida del soporte añadiendo 20 mL de tampón fosfato 25 mM pH 7.0 con 0.5% (v/v) Triton-X100 por gramo de soporte.

Tabla 2.1. Primers utilizados para la mutagénesis dirigida de BTL

Mutante / Siglas	Plásmido templado	Primers ^a
BTL-C65S	pT1BTL2	Cys/Ser 65-5' 5'- CAACTGGGACCGGGCGagcGAAGCGTACGCCAG' Cys/Ser 65-3' 5'- CTGGGCGTACGCTTCgctCGCCCGGTCCCAGTTG'
BTL-C65S/C296S (BTL-*)	pT1BTL2mutC65S	Cys/Ser 296-5' 5'-GCGGTCGTAagcGCCCCGTTTC Cys/Ser 296-3' 5'- GAAACGGGGCgctTACGACCGC
BTL-C65S/C296S/A192C	pT1BTL2mutCys ^b	Ala/Cys 192-5' 5'-GAAAGCGtgcGCTGTGCCAG Ala/Cys 192-3' 5'- CTGGCGACAGCgcaCGCTTTC
BTL- C65S/C296S/A192C/F20 6C (BTL-DSSD)	pT1BTL2mutCys/A192 C	Phe/Cys207-5' 5'- GTTGAAAGCGGGCGGCTGTCCGctgcAATGTGCCGTACAC GAGTCAAG' Phe/Cys207-3' 5'- CTTGACTCGTGTACGGCACATTgcaGGCGACAGCCGCCG CTTCAAC

^a El cambio en el nucleótido para introducir la mutación se indica en minúscula

^b Plásmido con mutante de BTL sin las 2 Cys nativas (Cys65 y Cys 296)

3.4. Inmovilización en agarosa activada con Bromuro de cianógeno (BrCN).

0.3 g de agarosa activada con BrCN liofilizada se hidrata durante al menos 30 minutos en 10 mL agua destilada acidificada a pH 2.5. Al soporte filtrado sin lavar se agrega 10 mL de la solución de enzima purificada en tampón fosfato 25 mM pH 7.0. Se incuba durante 3 horas, y posteriormente se lava e incuba durante 1 hora en una solución 1 M de etanolamina pH 8.0 para bloquear los grupos remanentes del soporte. Se filtra y lava con abundante agua destilada.

3.5. Ensayo de actividad Enzimática (pNPB)

La actividad enzimática de cuantifico como esta descrito en la sección 3.7 del Capítulo 1 (pág. 25).

3.6. Ensayo de actividad enzimática frente a esteres con diferentes longitud de cadena.

Al igual que en el punto anterior, el ensayo se llevó a cabo midiendo el aumento en el valor de absorbancia a 348 nm producido por la formación de p-nitrofenol. En este caso se utilizaron distintos sustratos (pNP-esteres) con diferentes longitud de cadena (C₂: pNP-acetato, C₄: pNP-butirato; C₈: pNP-octanoato; C₁₂: pNP-docanoato; C₁₆: pNP-palmitato). La hidrólisis se llevó a cabo en una mezcla de 40%

(v/v) de DMSO en 25 mM de tampón fosfato sódico a pH 7.0 y 25°C utilizando una concentración de sustrato de 0.2 mM. Para iniciar la reacción, 0.05-0.2 mL de la solución o suspensión enzimática se añadió a 2.5 mL de sustrato. Una unidad internacional de actividad de pNP-éster define como la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 1 μ mol de pNP-éster por minuto (IU) bajo las condiciones descritas anteriormente.

3.7. *Inhibición irreversible de los catalizadores por dietil-p-nitrofenilfosfato (D-pNP)*

0.2 g de los catalizadores de BTL fueron suspendidos en 4 mL de tampón fosfato 25 mM pH 7.0 a 25°C con y sin la presencia de 0.5% (v/v) de TritónX-100. Después a esta solución se añadió 1.5 mM del inhibidor (D-pNP) (20 μ L de una solución 300 mM disuelta en acetonitrilo) y se mantuvo en agitación magnética. Periódicamente se midió la actividad enzimática (como en el punto 3.5), hasta la actividad del catalizador sea cero.

3.8. *Cuantificación de grupos tioles de los catalizadores inmovilizados*

Los grupos tioles se cuantificaron mediante el método previamente descrito por Ellman (Ellman 1959). 0.2 g del catalizador de BTL fue incubado en 2 mL en una solución de DTT 50 mM en tampón fosfato 25 mM pH 8.0 a 25 °C durante 30 minutos. Después los catalizadores fueron filtrados y lavados con agua destilada hasta desaparecer el DTT por completo.

Posteriormente, 0.2 g de BTL fueron incubados por 30 minutos en una solución de 1.5 mM de DTBN en tampón fosfato 250 mM pH 8.0. Posteriormente se cuantificó la absorbancia del sobrenadante a 412 nm para determinar los moles de 5-tiol-2-ácido nitrobenzoico ($\epsilon=14150 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), que se correlaciona equimolarmente con los moles de cisteínas presentes en la muestra.

3.9. *Inducción de la formación de enlace disulfuro*

Se estudió las condiciones que favorecían la formación de un puente disulfuro entre las cisteínas introducidas en la variante BTL-DSSD. Como primer paso 1 g del mutante BTL-DSSD previamente inmovilizado, se redujo en una solución de DTT 50 mM en tampón fosfato 25 mM pH 8.0 durante al menos 30 minutos. Posteriormente se filtra y lava con abundante agua hasta eliminar el DTT. Posteriormente se estudiaron diferentes condiciones de oxidación y aditivos para favorecer la formación de los enlaces disulfuros. Se utilizando 2 agentes oxidantes: glutatión oxidado (GSSG) 50 mM en tampón fosfato 25 mM pH 8.0 y oxígeno mediante agitación mecánica en un recipiente abierto. 1 g del mutante BTL-DSSD inmovilizado y previamente reducido se incubó en 10 mL de distintas soluciones durante 16 horas. Adicionalmente se utilizaron distintos aditivos: hidrocloreuro de guanidina (GndHCl) (1 M, 2 M y 8 M), TritónX-100 (0.1% v/v), sulfato de cobre (5 mM). Posteriormente el catalizador se lavó con abundante agua destilada y se cuantificó actividad específica y los grupos tioles libres.

3.10. Ligación de las cisteínas del mutante BTL-C65S/C296C/A192C/F207C (BTL-DSSD)

La preparación del catalizador BTL-DSSD consiste en 3 etapas: reducción, oxidación, desulfurización.

Reducción: 1 g del mutante BTL-DSSD previamente inmovilizado, es reducido en una solución de DTT 50 mM en tampón fosfato 25 mM pH 8.0 durante al menos 30 minutos. Posteriormente se filtra y lava con abundante agua hasta eliminar el DTT.

Oxidación: 1 g de BrCN-DSSD es suspendido en 10 mL de una solución tampón fosfato 25 mM pH 8.0 con 0.1% (v/v) de TritonX-100. La suspensión se mantiene durante 16 horas en agitación mecánica (300 rpm) en un recipiente expuesto al aire. Posteriormente se filtra y lava con agua destilada.

Desulfuración: 1 g de BTL-DSSD inmovilizado y previamente oxidado se suspendió en una solución de 70 mM de tampón CAPS pH 9.5 con 15 mM de Tris(dimetilamino)fosfina (HMPT), se incubó durante 16 horas. Posteriormente se filtró y lavó con abundante agua destilada.

3.11. Espectrometría de Fluorescencia

Los espectros de fluorescencia se realizaron como esta descrito en la sección 3.11 del Capítulo 1 (pág. 26).

3.12. Hidrolisis enantioselectiva de feniletil acetato (5)

El sustrato 5 (5.0 mM) fue disuelto en 10 mL de tampón fosfato de sodio 25 mM pH 7.0. Posteriormente a 0.25 g del catalizador inmovilizado se añadió 5 mL de la solución del sustrato, manteniéndolas a 25°C y agitación constante. Se analizó la conversión mediante HPLC en fase reversa (Spectra Physic SP 100 acoplado con un detector UV Spectra Physic SP 8450). Se empleó una columna Kromasil C8 (25x0.4 cm) suministrada por Análisis Vínicos. Como fase móvil se utilizó una mezcla isocrática de 35% (v/v) de acetonitrilo en 10 mM tampón amonio fosfato a un pH final de 4.0 a un flujo de 1.5 mL/min. La detección UV se realizó a 220 nm. Una unidad internacional de actividad se definió como la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 1 μ mol del sustrato por minuto (IU) bajo las condiciones descritas anteriormente. Los tiempos de retención fueron 3.1 y 9.3 minutos para (5a) y (5) respectivamente.

Determinación del exceso enantiomérico: El exceso enantiomérico del alcohol 5a fue analizado mediante HPLC quiral en fase reversa a 15-20% de conversión. Se empleó una columna Chiracel OD-R, utilizando como fase móvil una mezcla isocrática de 35% (v/v) de acetonitrilo en 10 mM tampón amonio fosfato a un pH final de 4.0 a un flujo de 1.0 mL/min. La detección UV se realizó a 210 nm.

3.13. Hidrolisis enantioselectiva de etil-2-hidroxi-4-fenilbutirato (6) (HPBet)

El sustrato 6 (5.0 mM) fue disuelto en 10 mL de tampón fosfato de sodio pH 7.0. Posteriormente a 0.25 g del catalizador inmovilizado se añadió 5mL de la solución del sustrato, manteniéndolas a 25°C y agitación constante. Se analizó la conversión mediante HPLC en fase reversa (Spectra Physic SP 100

acoplado con un detector UV Spectra Physic SP 8450). Se empleó una columna Kromasil C8 (25x0.4 cm) suministrada por Análisis Vínicos. Como fase móvil se utilizó una mezcla isocrática de 40% de acetonitrilo en 10 mM tampón amonio fosfato a un pH final de 3.0 a un flujo de 1.5 mL/min. La detección UV se realizó a 220 nm. Una unidad internacional de actividad se definió como la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 1 μ mol del sustrato por minuto (IU) bajo las condiciones descritas anteriormente. Los tiempos de retención fueron 3.5 y 8.3 minutos para (6a) y (6) respectivamente.

Determinación del exceso enantiomérico: El exceso enantiomérico del ácido 6a fue analizado mediante HPLC quiral en fase reversa a 15-20% de conversión. Se empleó una columna Chiracel OD-R, utilizando como fase móvil una mezcla isocrática de 20% (v/v) de acetonitrilo en 10 mM tampón amonio fosfato a un pH final de 2.3 a un flujo de 0.5 mL/min. La detección UV se realizó a 220 nm.

3.14. Hidrolisis enantioselectiva de Acido (\pm)-2-O-butiril-2-fenilacético (7)

El sustrato 7 (5.0 mM) fue disuelto en 10 mL de tampón fosfato de sodio 25 mM pH 7.0. Posteriormente a 0.25 g del catalizador inmovilizado se añadió 5mL de la solución del sustrato, manteniéndolas a 25°C y agitación constante. Se analizó la conversión mediante HPLC en fase reversa (Spectra Physic SP 100 acoplado con un detector UV Spectra Physic SP 8450). Se empleó una columna Kromasil C8 (25x0.4 cm) suministrada por Análisis Vínicos. Como fase móvil se utilizó una mezcla isocrática de 35% (v/v) de acetonitrilo en 10 mM tampón amonio fosfato a un pH final de 2.3 a un flujo de 1.5 mL/min. La detección UV se realizó a 220 nm. Una unidad internacional de actividad se definió como la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 1 μ mol del sustrato por minuto (IU) bajo las condiciones descritas anteriormente. Los tiempos de retención fueron 2.7 y 16.1 minutos para (7a) y (7) respectivamente.

Determinación del exceso enantiomérico: El exceso enantiomérico del ácido 7a fue analizado mediante HPLC quiral en fase reversa a 15-20% de conversión. Se empleó una columna Chiracel OD-R, utilizando como fase móvil una mezcla isocrática de 5% (v/v) de acetonitrilo en 10 mM tampón amonio fosfato a un pH final de 2.3 a un flujo de 0.5 mL/min. La detección UV se realizó a 220 nm.

3.15. Hidrolisis enantioselectiva de dimetilfenilglutarico (4)

La hidrolisis y la cuantificación de (4) se realizaron como esta descrito en la sección 3.14 del Capítulo 1 (pág. 27).

4. Resultados

4.1. Estudio bioinformático y diseño del mutante BTL.

El diseño del mutante con dos cisteínas en la zona del lid se realizó en conjunto con el Grupo de Cristalografía Macromolecular y Biología Estructural, Instituto de Química-Física Rocasolano (CSIC). Como se ha mencionado previamente, la lipasa BTL tiene la particularidad de sufrir un gran cambio conformacional entre sus formas cerradas y abiertas (Carrasco-Lopez et al. 2009). Basándose en esta característica se diseñó un mutante que tuviese 2 cisteínas dispuestas de tal forma que en la conformación cerrada de la lipasa estuviesen distantes, pero cuando se induce la conformación abierta (por ej. por adición de detergentes) se encuentre lo suficientemente próximas para reaccionar entre sí, formando un enlace disulfuro, que estabilice la estructura abierta de la proteína.

En un comienzo se realizó un análisis *in silico* utilizando el software DbD V1.20 (Dombkowski 2003), el cual predice las potenciales parejas de aminoácidos susceptibles de reaccionar entre sí para formar un puente disulfuro, basado en la distancia y geometría de las cisteínas introducidas. Los resultados mostraron que todos los aminoácidos en la zona del lid tienen una baja probabilidad de formar un enlace disulfuro. A pesar de esto se decidió diseñar un mutante basándose en las estructuras cristalizadas de ambas conformaciones de la lipasa.

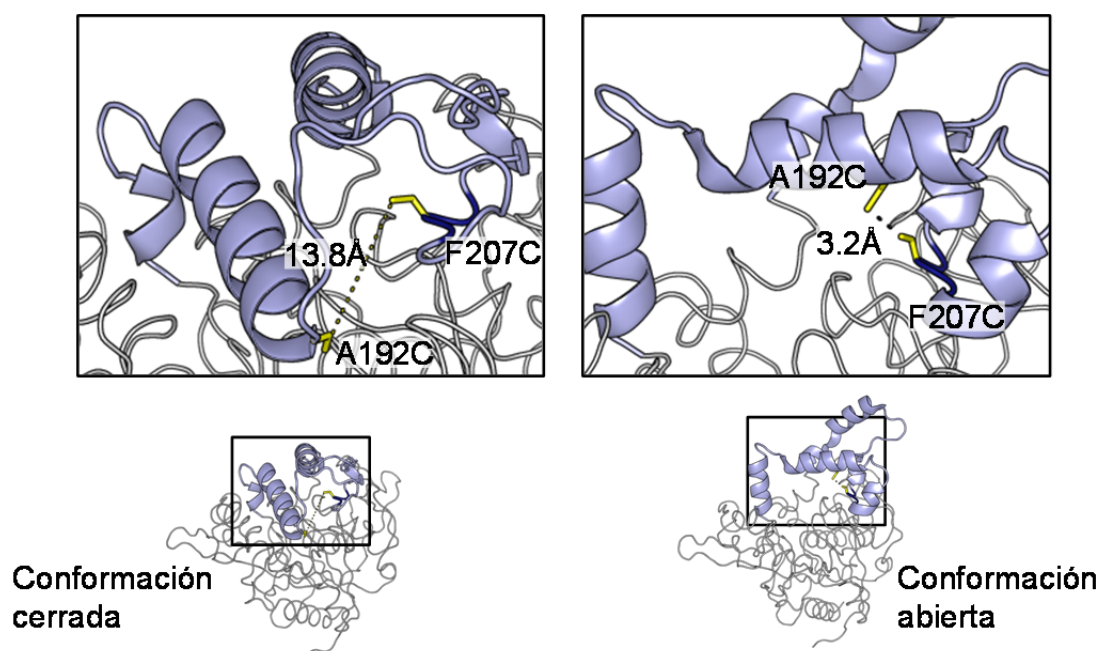


Figura 2.4. Diseño del mutante de BTL-C65S/C296S/A192C/F207C con un puente disulfuro en el lid.

Al analizar los modelos de ambas conformaciones, cerrada y abierta, se observó que durante el movimiento del lid, que se desplaza alrededor de 20 Å, algunos aminoácidos permanecen relativamente inmóviles D206-F207-K208 (en color azul oscuro en la Figura 2.4). Se analizaron los aminoácidos que se encontraban relativamente cercanos para poder reaccionar entre sí. A partir de esto, se seleccionaron las

posiciones A192 y F207 para ser sustituidas por cisteínas. Como se puede observar en la Figura 2.4, C192 se encuentra localizada en una de las cadenas α -hélices ($\alpha 6$) del lid y se desplaza más de 18 Å entre las conformaciones cerradas y abierta. Por otra parte la C207 se encuentra en el loop que une ambas α -hélices ($\alpha 6$ y $\alpha 7$) que conforman el lid y no se desplaza entre el cambio de conformaciones. Inicialmente en la estructura cerrada ambas cisteínas se encuentran a 13.8 Å de distancia, en cambio en la conformación abierta esta distancia se reduce tan solo a 3.2 Å (Figura 2.4).

A continuación, en cooperación con la Dra. Blanca de las Rivas del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN), se procedió al diseño de primers, clonaje y expresión de la nueva variante de BTL.

4.2. Formación de enlace disulfuro

Las dos enzimas, BTL-WT y el mutante BTL-C65S/C296S/A192C/F207C (por simplicidad BTL-DSSD), fueron expresados en *E.coli*, purificados e inmovilizado en agarosa activada con BrCN en ambos casos con una carga enzimática de 5 mg de lipasa/g de soporte, obteniéndose rendimientos mayores de 95%. Como primer paso y con el objetivo de reducir las cisteínas, el catalizador se incubó en una solución de DTT 50 mM durante 30 minutos. Una vez reducido, el mutante fue incubado a distintas condiciones de oxidación, en la presencia de detergente (0.1% (v/v) de tritón-X100) para inducir la apertura del lid y que ambas cisteínas estuviesen colindantes. Para facilitar la formación del puente disulfuro es necesario la adición de un agente oxidante, en este caso se estudió la adición de glutatión (GSSG) y oxígeno (mediante exposición al aire). Después de ser incubado durante 16 horas en condiciones oxidantes, al mutante inmovilizado BTL-DSSD se le cuantificaron la actividad específica y el número de cisteínas libres. Se observó que la actividad permaneció constante tras la oxidación en presencia de GSSG o mediante aireación. Al cuantificar el porcentaje de cisteínas libres mediante el método de Ellmann, se observó una disminución de alrededor de un 50%, que se traduce en un bajo rendimiento (50%) en la formación de enlaces disulfuro. Posiblemente esté bajo rendimiento se debe a que a pesar de la cercanía de ambas cisteínas (3.4 Å), la geometría en la cual están las cisteínas 192 y 207 no es la más favorable para la formación del enlace (Hazes y Dijkstra 1988), tal como lo había previsto el análisis *in silico* utilizando el software DbD V1.20 (Dombkowski 2003).

Con el objetivo de aumentar el rendimiento en la formación de los enlaces disulfuros se estudió la adición de hidrocloreto de guanidina (GndHCl), para de aumentar la flexibilidad de la proteína y por lo tanto la probabilidad de que ambas cisteínas reaccionen entre sí. Se estudiaron 3 concentraciones de GndHCl, en los 2 agentes de oxidantes (Tabla 2.2). A la mayor concentración de GndHCl y utilizando oxígeno como agente oxidante se obtuvo el mejor rendimiento en la formación de enlaces disulfuros, con solo un 25% de las cisteínas no habían reaccionado entre sí. Sin embargo, el uso de GndHCl tiene un efecto perjudicial sobre la actividad final recuperada del catalizador, recuperando solo un 63% de la actividad.

Por esta última razón se descartó el uso de GndHCl como aditivo para facilitar la formación de enlaces disulfuros.

Adicionalmente, se ha descrito que el uso de algunos aditivos como sales de cobre pueden favorecer la oxidación y formación de enlaces disulfuros en proteínas (Clark 2001). Bajo este supuesto se utilizó como medio de oxidación una solución de tampón fosfato con 0.1% de Tritón y 5 mM de CuSO_4 , sin embargo solo se observó una disminución en los enlaces disulfuros formados (Tabla 2.2).

En la Tabla 2.2 se muestra un resumen de los resultados obtenidos, para la formación de enlaces disulfuros entre las cisteínas introducidas genéticamente en BTL. En ninguna de las condiciones estudiadas fue posible obtener un elevado rendimiento de formación de enlaces disulfuros, por esto se decidió utilizar una estrategia diferente para estabilizar la estructura abierta de la lipasa.

Tabla 2.2. Cisteínas libres y actividad específica del mutante BTL-DSSD a distintas condiciones de oxidación.

Agente Oxidante	Medio de reacción	Cisteínas libres	Actividad relativa
50 mM GSSG	0.1% Tritón	55	97
50 mM GSSG	1 M GndCl	43	82
50 mM GSSG	2 M GndHCl	41	70
50 mM GSSG	8 M GndHCl	37	55
O_2	0.1% Tritón	49	95
O_2	1 M GndHCl	45	81
O_2	2 M GndHCl	37	76
O_2	8 M GndHCl	25	63
$\text{O}_2 + \text{Cu}^{2+}$	0.1% Tritón	69	94

^a Cuantificación mediante reactivo de Ellmann

4.3. Estrategia de ligación de cisteínas introducidas en la zona del lid.

Para soslayar los bajos rendimientos en la formación de los enlaces disulfuros se diseñó una estrategia diferente de modificación, que consiste de 3 etapas. Un esquema de la estrategia se muestra en la Figura 2.5. En una primera etapa, las cisteínas se oxidan formando disulfuros y ácido sulfénico como productos mayoritarios. Posteriormente mediante una reacción de desulfuración, el enlace disulfuro formado es convertido a tioeter, generando un enlace irreversible en condiciones reductivas. Por último, en una tercera etapa se reducen las cisteínas oxidadas (como ácido sulfénico) para después repetir el ciclo (Figura 2.5).

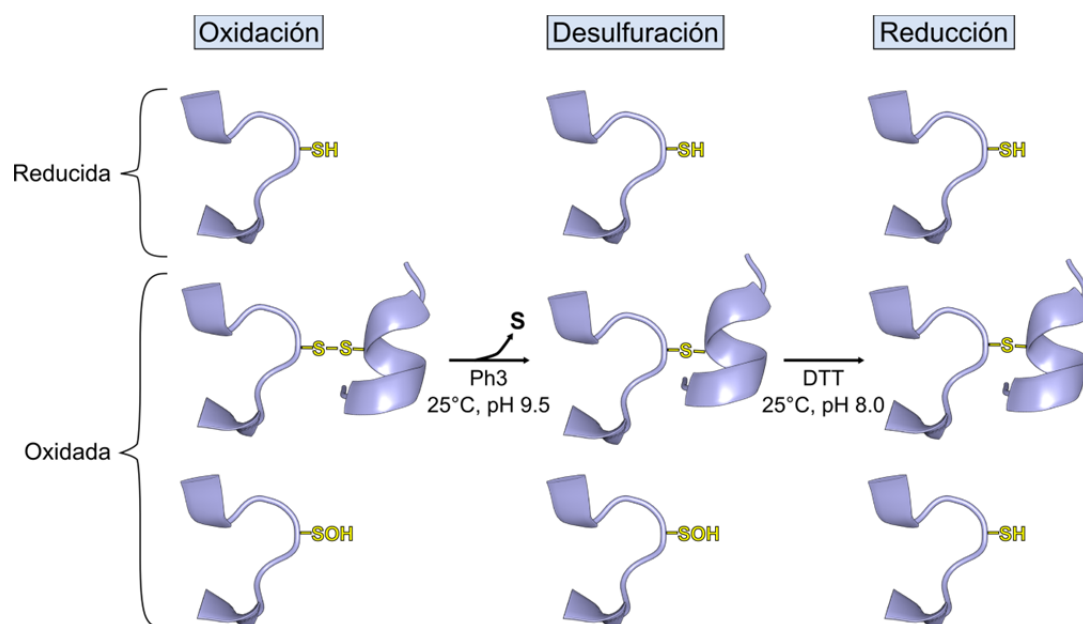


Figura 2.5. Esquema de la estrategia de ciclos sucesivos de oxidación.

Para la primera etapa se seleccionó la aireación en presencia de 0.1% de Triton-X100 como condición oxidante. Esta condición fue la que presentó un mayor rendimiento en la formación de disulfuros sin afectar la actividad específica de la lipasa (Tabla 2.2). En la segunda etapa de desulfuración, se utilizó el protocolo descrito previamente (Bernardes et al. 2008b), mediante la incubación de la lipasa inmovilizada en presencia de una fosfina orgánica (HMPT) a pH básico. Como agente reductor en la última etapa se utilizó DTT.

Utilizando esta estrategia, se llevó a cabo 4 ciclos de oxidación con el mutante BTL-DSSD inmovilizado en BrCN. En la Figura 2.6.A, se muestra la evolución de las cisteínas libres y la actividad conservada durante los ciclos de oxidación. Se puede observar, que el rendimiento en la formación de disulfuros permanece constante en los 4 ciclos realizados, alrededor del 50%, y a medida que transcurren los ciclos la cantidad de cisteínas libres disminuye, hasta alrededor del 4% al final del cuarto ciclo. Por el contrario, a medida que aumentan los ciclos la actividad enzimática disminuye, llegando a un 60% de la actividad inicial después de 4 ciclos. Para descartar que esta disminución en la actividad catalítica de la lipasa se deba a un proceso de inactivación en las condiciones de modificación (oxidación de otros aminoácidos, pH alcalino durante la reacción de desulfuración), se llevó a cabo los mismos ciclos de oxidación con la enzima BTL-WT inmovilizada en BrCN-agarosa. Después de cuatro ciclos de oxidación, no se observó una disminución significativa en la actividad del catalizador BTL-WT. Probablemente esta disminución en la actividad del mutante BTL-DSSD se deba a los cambios conformacionales promovidos por la modificación química y la consecuente rigidificación de la proteína.

Mediante esta estrategia fue posible la ligación de 2 cisteínas aunque su disposición geométrica no sea la más favorable para formación del enlace disulfuro. Además, esta estrategia tiene la ventaja de que el resultado de la ligación entre las cisteínas es un enlace irreversible.

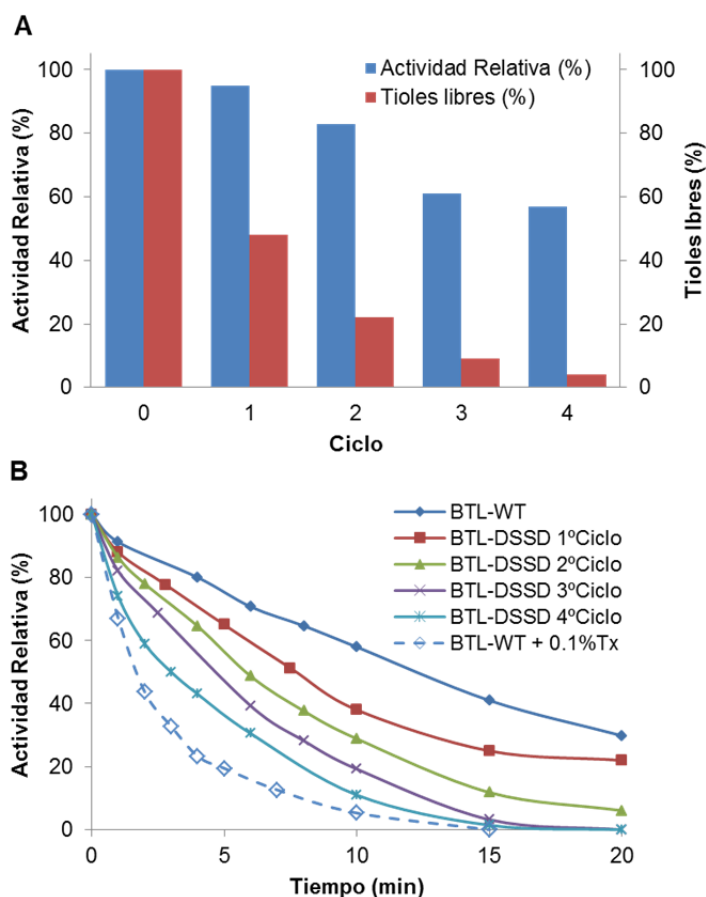


Figura 2.6. Evolución de distintos parámetros de BrCN-DSSD durante los ciclos de oxidación/reducción. **A)** Cisteínas libres y la actividad específica. **B)** Cinéticas de inhibición con D-pNP.

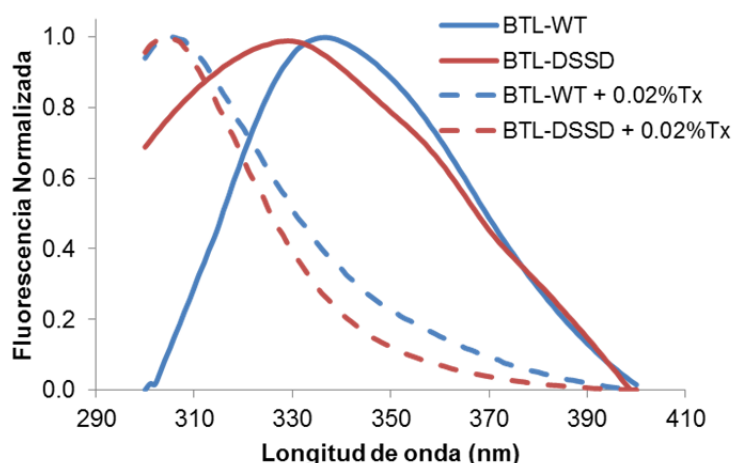
Con el propósito de evaluar el efecto de la ligación de las cisteínas y por lo tanto el grado de cambio en la conformación de la proteína sobre el mecanismo catalítico de la lipasa, se estudió la inhibición irreversible de la enzima, utilizando dietil-p-nitrofenilfosfato (D-pNP). El D-pNP es un compuesto organofosforado que reacciona de forma específica e irreversible con el sitio activo de la lipasa, debido a la fosforilación de la serina catalítica (Raushel 2002). En la Figura 2.6.B se muestran las cinéticas de inhibición de los catalizadores BTL-WT y BTL-DSSD, después de cada ciclo de inhibición. Se puede observar en el caso del variante BTL-WT después de 10 minutos, conservó el 58% de la actividad, sin embargo cuando la inhibición se realizó en presencia de 0.1% (v/v) de tritón (condición donde el equilibrio conformacional de la lipasa se encuentra desplazado hacia la forma abierta), BTL-WT conserva solo un 5% de la actividad inicial. Esto indica que la velocidad inhibición está directamente relacionada con el grado de exposición de la serina catalítica y por lo tanto que tan desplazado se encuentra el equilibrio de la lipasa hacia la conformación abierta.

Al analizar la variante BTL-DSSD sometido a un ciclo de oxidación, este muestra un 38% de la actividad después de 10 minutos en presencia de D-PNP. A medida que el catalizador BTL-DSSD se somete a un nuevo ciclo de oxidación la actividad decrece más rápido, preservando solo alrededor del 10% después de 10 minutos tras el cuarto ciclo de oxidación. Por lo tanto, al parecer la modificación química mediante la ligación de las cisteínas introducidas (192C y 206C), promueve una mayor exposición al medio de la serina catalítica. Esta mayor exposición, posiblemente es causada por el cambio estructural sufrido, donde probablemente se favorezca una conformación más abierta de la lipasa con los consiguientes cambios en sus propiedades catalíticas.

4.4. Estudios estructurales: espectrometría de fluorescencia.

Con el objetivo de evaluar los posibles cambios conformacionales generados en el mutante BTL-DSSD, se llevó a cabo el análisis de fluorescencia de los catalizadores inmovilizados. Se monitoreó la fluorescencia intrínseca de los residuos triptófano de las lipasas inmovilizadas, usando como longitud de excitación 280 nm. Las medidas se realizaron en dos condiciones, en ausencia y presencia de TritonX-100, para poder analizar las conformaciones cerrada y abierta de la lipasa, respectivamente. Los espectros de fluorescencia de los catalizadores se muestran en Figura 2.7, así como la longitud de onda de máxima emisión (λ_{max}). En el caso de BTL-WT se puede observar que la presencia de detergente produce un desplazamiento en λ_{max} desde 338 nm a 306 nm (32 nm). Sin embargo, para el caso de BTL-DSSD este desplazamiento es menor, 24 nm. Este desplazamiento en la λ_{max} se puede explicar en la diferencia en la exposición de los residuos Trp212 y Trp235 (presentes en la región del lid), promovidos por la activación interfacial debido al detergente.

Es interesante apreciar como la formación del puente disulfuro en el variante BTL-DSSD produce un desplazamiento de 10 nm en la λ_{max} hacia longitudes de onda menores. Esto podría indicar, y como lo sugiere los resultados de inhibición irreversible, que la ligación de las cisteínas introducidas favorezca una conformación más abierta, quizás parcialmente, incluso en ausencia de detergentes.



Variante	λ_{max} (nm)		$\Delta \lambda_{\text{max}}$
	Cerrada ^a	Abierta ^b	
BTL-WT	338	306	32
BTL-DSSD	328	304	24

^a Medida en H₂O ^b Medida en H₂O+0.02%Tx

Figura 2.7. Espectro de fluorescencia de los catalizadores de BTL. Se incluye el valor λ_{max} .

4.5. Evaluación de las propiedades catalíticas

A continuación se evaluaron distintas propiedades de BTL-DSSD, especificidad frente a sustratos de distinta longitud de cadena alifática, actividad a distintas temperaturas y fuerza iónica, actividad y enantioselectividad en la resolución cinética de distintos esteres. Además se evaluó la estabilidad térmica del nuevo catalizador.

a. Actividad de las variantes frente a esteres con diferente longitud de cadena:

Con el objetivo de estudiar el efecto de los cambios conformacionales producidos por la inserción de un puente disulfuros sobre las propiedades catalíticas de BTL-DSSD, se estudió la actividad frente a p-nitrofenil esteres con distintas longitudes de cadena, en ausencia y presencia de detergente (Figura 2.8). Como se observa en la Figura 2.8.A modificación generó un cambio en la especificidad de la lipasa, BTL-WT presentó su máxima actividad frente a pNP-docaenoato (C12), en cambio la variante BTL-DSSD es más activo frente a pNP-octanoato (C8). El derivado BTL-DSSD presentó una actividad específica menor en comparación a BTL-WT frente a todos los sustratos estudiados, esta diferencia fue más notoria con sustratos de cadena más larga (C12-C16).

Cuando la actividad fue cuantificada en presencia de detergente (Figura 2.8.B), se observó que la hiperactivación para la lipasa BTL-WT es independiente de la longitud de cadena del sustrato, entre 2-2.5 veces para sustratos (C2-C12) (Figura 2.8.C). En cambio, el derivado BTL-DSSD mostró una hiperactivación diferente dependiendo de la longitud de la cadena del sustrato. Para sustratos de cadena corta (C2-C4) mostró valores de hiperactivación alrededor de 1.2 y para cadenas medias como C8 valor

de 2.2. Sorprendentemente para los sustratos de cadena más larga mostró un gran incremento en presencia de detergente, se observó para C12 una hiperactivación de más de 14 veces (Figura 2.8.C). En el caso del sustrato C16, el catalizador BTL-DSSD fue capaz de hidrolizarlo en presencia de detergente.

Posiblemente, el catalizador BTL-DSSD presente una conformación parcialmente abierta, ya que con sustratos de cadena corta no se hiperactiva en presencia de detergentes. Además de parcialmente abierta la conformación de BTL-DSSD parece ser más rígida, ya que cuando utilizó un sustrato de longitud de cadena más larga (C12-C16) no mostró actividad o esta fue muy baja. Posiblemente el lid de BTL-DSSD está fijado en una posición parcialmente abierta, que no permite la entrada a sustratos de longitudes de cadena larga y que solo en presencia de detergentes se desplaza para hidrolizar sustratos de gran tamaño.

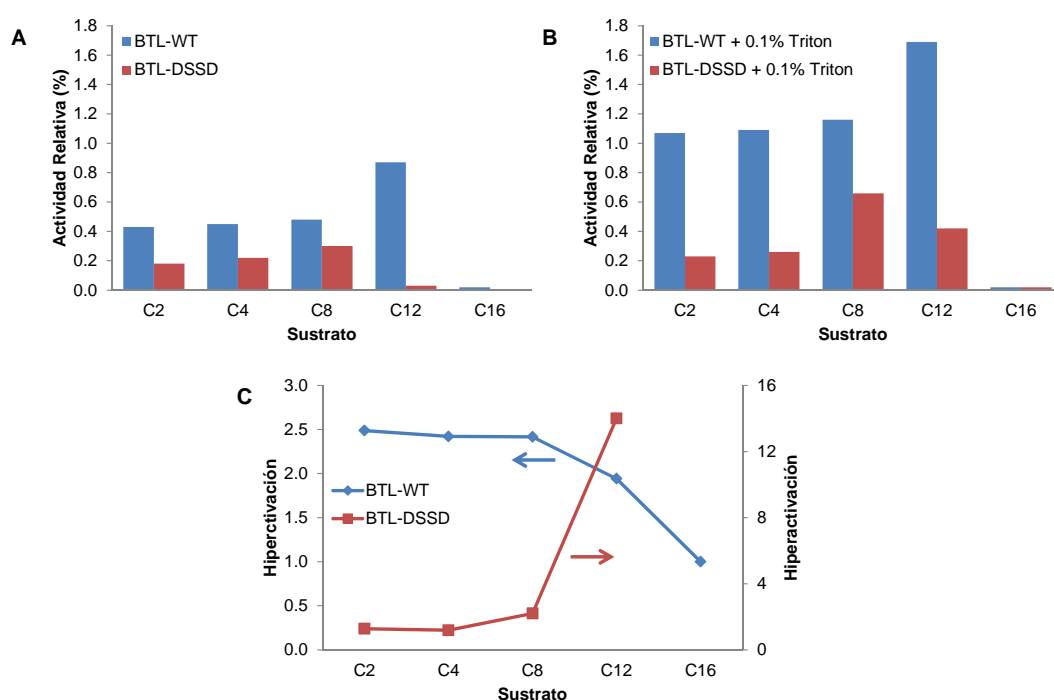


Figura 2.8. Actividad de los catalizadores de BTL frente a pNP's de distinto longitud largo de cadena. **A)** Actividad a pH 7.0 en ausencia de detergente **B)** Actividad a pH 7.0 en presencia de 0.1% de TritonX-100 **C)** Hiperactivación de los catalizadores de BTL.

b. Efecto de la fuerza iónica sobre la actividad:

Una mayor fuerza iónica promueve la conformación cerrada y menos activa de las lipasas (Brzozowski et al. 2000), por este motivo se estudió la actividad de las variantes inmovilizadas de BTL a distintas concentraciones de tampón fosfato. La actividad relativa de BTL-WT y BTL-DSSD a distintas concentraciones de tampón fosfato medidas a 25°C se muestra en la Figura 2.9. Se puede observar que la variante BTL-DSSD es notoriamente más activa que BTL-WT en todas las concentraciones estudiadas, destacándose que a una concentración de 500 mM de tampón fosfato el catalizador BTL-DSSD retiene el 94% de la actividad relativa (en comparación a su misma actividad a baja fuerza iónica, 25 mM tampón

fosfato). Por el contrario, BTL-WT expresa solo el 57% de la actividad relativa, a estas mismas condiciones. La ligación de las cisteínas en la zona del lid al parecer promueve una estructura diferente, parcialmente abierta y más rígida. Adicionalmente, el hecho de generar enzimas capaces de tolerar elevadas fuerzas iónicas, puede tener un gran potencial biotecnológico, y aplicaciones tan diversas como líquidos iónicos o líquidos eutécticos.

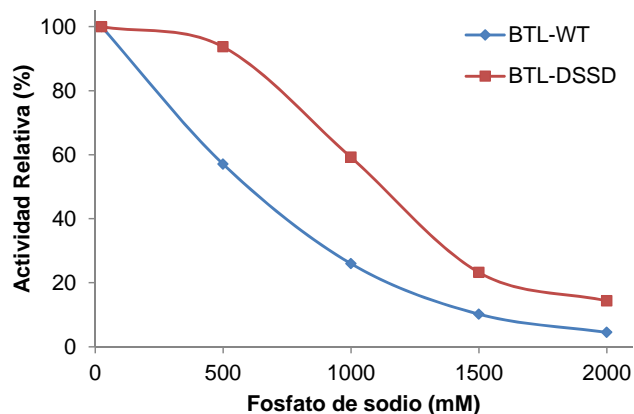


Figura 2.9. Actividad relativa a diferentes fuerzas iónicas.

c. Efecto de temperatura sobre la actividad:

Otro parámetro estudiado fue la actividad específica de BTL-WT y BTL-DSSD a distintas temperaturas. En la Figura 2.10, se muestra el perfil de actividad v/s temperatura para ambas variantes. Se observó que a bajas temperaturas la variante BTL-DSSD es significativamente menos activa que BTL-WT, alrededor de 3.5 veces menos. Sin embargo, a medida que la temperatura aumenta, esta diferencia se hace menor, alrededor de 1.2 veces a 80°C. Como se puede observar en la figura, en el caso de BTL-DSSD la máxima actividad relativa se alcanza a los 70°C, que implica un aumento en 10°C en comparación a BTL-WT. Esto concuerda con descrito previamente para lipasas inmovilizadas sobre soportes hidrofóbicos, donde la conformación abierta se encuentra estabilizada (Palomo et al. 2002b; Palomo et al. 2004). Es posible que la ligación de las cisteínas promueva la rigidificación de la estructura de la lipasa generando un catalizador más activo a elevadas temperaturas.

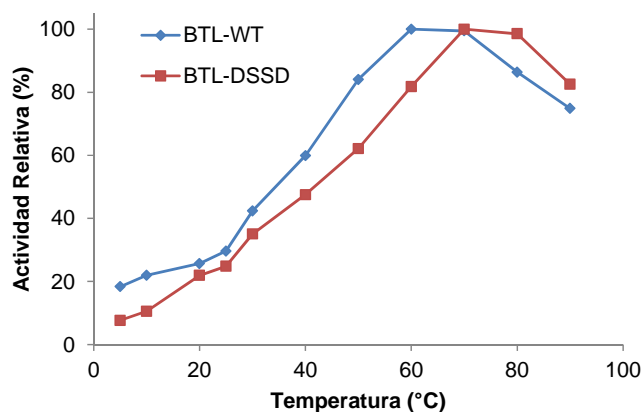


Figura 2.10 Actividad v/s temperaturas de BTL-WT y BTL-DSSD.

d. Estabilidad térmica:

Adicionalmente se analizó la estabilidad térmica a 60°C de ambas variantes, que se muestra en la Figura 2.11. Como se podría esperar, la incorporación de un enlace disulfuro en la zona del lid confiere una mayor estabilidad a la lipasa, aumentando en 5 veces el tiempo de vida media de BTL-DSSD en comparación con BTL-WT. Esto concuerda con lo descrito para la inmovilización de la lipasa BTL sobre soportes hidrofóbicos (Palomo et al. 2002b; Palomo et al. 2004) donde la conformación abierta se encuentra estabilizada.

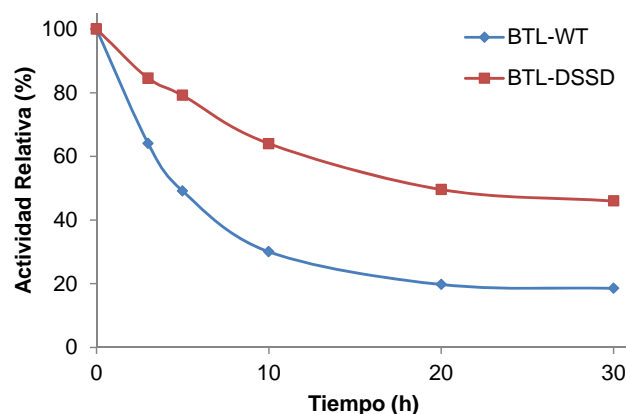


Figura 2.11. Estabilidad térmica a pH 55°C de los derivados inmovilizados BTL-WT y BTL-DSSD

e. Enantioselectividad

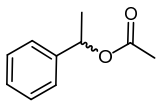
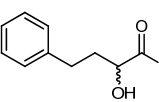
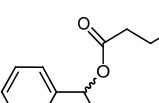
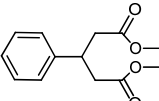
Además se estudió la influencia de la modificación sobre la actividad y enantioselectividad en la resolución de diversos esteres racémicos.

En la Tabla 2.3, se muestra un resumen de los resultados obtenidos con ambos catalizadores. Sorprendentemente se puede observar que el catalizador BTL-DSSD muestra una elevada enantioselectividad en la hidrólisis de (5). Este resultado representó un aumento de más de 2 veces en comparación con BTL-WT.

Adicionalmente se adicionó detergente en el medio de reacción para las hidrólisis de (5) y (6). Se puede observar que para ambos sustratos BTL-DSSD presenta una mayor hiperactivación que BTL-WT, fortaleciendo la hipótesis de que BTL-DSSD representa una estructura nueva, parcialmente abierta con nuevas e interesantes propiedades.

Para los sustratos (6) y (7) no se observan mejoras para el catalizador BTL-DSSD. Por el contrario al observar los resultados que se obtuvieron para la hidrólisis asimétrica de (4), se logró un buen incremento en la enantioselectividad sin perjuicio de la actividad de catalizador. BTL-DSSD mostró un aumento de 68 a 86% de e.e. en comparación a BTL-WT.

Tabla 2.3. Resolución cinética de diversos esteres con BTL-WT

Sustratos	Catalizador	Condiciones de reacción ^a	Actividad específica	E.P	E ^c /F.A ^d	e.e. ^c
<i>(rac)</i> -5 	BTL-WT	pH 7.0	10.1	S	41.9	95
	BTL-DSSD	pH 7.0	0.9	S	86.8	98
	BTL-WT	pH 7.0 + 0.1%tx	14.8	S	73.7	97
	BTL-DSSD	pH 7.0 + 0.1%tx	3.2	S	37.5	95
<i>(rac)</i> -6 	BTL-WT	pH 7.0	32.0	R	5.7	70
	BTL-DSSD	pH 7.0	3.2	R	1.1	5
	BTL-WT	pH 7.0 + 0.1%tx	59.1	R	6.5	73
	BTL-DSSD	pH 7.0 + 0.1%tx	7.6	R	3.5	56
<i>(rac)</i> -7 	BTL-WT	pH 7.0	20.2	S	2.0	33
	BTL-DSSD	pH 7.0	6.6	S	1.6	23
<i>(rac)</i> -4 	BTL-WT	pH 7.0	8.48	S	5.3 ^d	68
	BTL-DSSD	pH 7.0	8.70	S	13.4 ^d	86

^a Reacción a la condición que se indica^b Definido como Sust (1): $\mu\text{mol}/\text{min } g_{\text{prot}}$ Sust (2): $\mu\text{mol}/\text{min } g_{\text{prot}} \cdot 10^{-3}$
Sust (3): $\mu\text{mol}/\text{min } g_{\text{prot}} \cdot 10^{-5}$ Sust (4): $\mu\text{mol}/\text{min } g_{\text{prot}} \cdot 10^{-6}$ ^c Determinado por HPLC a 15-20% de conversión^d F.A: Factor de asimetría, sustrato (4).

Finalmente como discusión final, luego de analizar las distintas propiedades catalíticas de BTL-DSSD, se observó claras diferencias con BTL-WT. Como se ha mencionado previamente, es posible que la introducción y posterior ligación de las cisteínas 192 y 207 promueva una conformación parcialmente abierta. Esto se apoya en los resultados de inhibición con D-pNP y fluorescencia (Figura 2.6 y 2.7). A su vez la ligación de estas cisteínas le otorga una mayor rigidez a la lipasa, especialmente en la zona del lid, lo que se traduce en una mayor estabilidad y actividad a elevadas temperaturas (Figuras 2.10 y 2.11). Al parecer esta rigidez, fija esta conformación parcialmente abierta, dificultando la transición a la conformación cerrada cuando el catalizador es incubado a elevadas fuerzas iónicas (Figura 2.9). De igual forma, esto explicaría porque BTL-DSSD puede hidrolizar sustratos de cadenas largas en presencia de detergente.

En la Figura 2.12 se observa un esquema del cambio en la conformación de la estructura de la lipasa mediante la ligación de dos cisteínas en la zona de lid. Como esta se encuentra “fijada” en un estado parcialmente abierto, dificultando la transición a los otros estados conformacionales.

Esta forma nueva parcialmente abierta, se muestra como una interesante estrategia de mejora en resoluciones cinéticas, ya que mediante este tipo de modificación fue posible lograr un importante aumento en el e.e. en la resolución de 4.

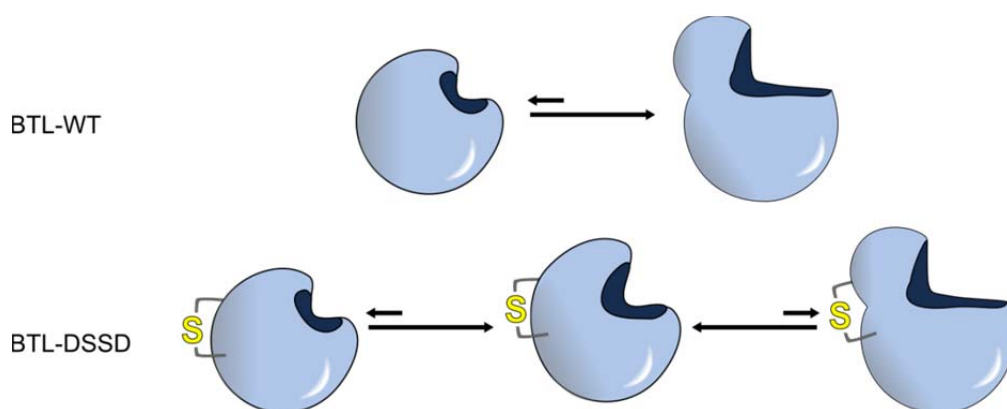


Figura 2.12. Esquema del cambio en la conformación de la estructura de la lipasa mediante la ligación de dos cisteínas en la zona de lid.

5. Conclusiones

Mediante una apropiada estrategia de modificación que combina el uso de herramientas de bioinformáticas, biología molecular y química de proteínas fue posible la exitosa ligación de dos cisteínas en la zona del lid de la lipasa de *G. Thermocatenolatus*.

- a. Se ha desarrollado una estrategia para ligar 2 cisteínas, aunque cercanas sin la geometría favorable para la formación de un puente disulfuro. Mediante una estrategia de 3 pasos oxidación, desulfuración y reducción. Después de 4 ciclos, es posible alcanzar una modificación cercana al 100%.
- b. A través de espectrometría fluorescencia se observó que la ligación de las cisteínas en el lid de la lipasa provoca cambios estructurales que favorece una conformación parcialmente abierta, incluso en ausencia de detergentes o superficies hidrofóbicas.
- c. El nuevo catalizador, BTL-DSSD, presenta interesantes mejoras en sus propiedades catalíticas en comparación con BTL-WT, de gran potencial para su aplicaciones en biotransformaciones:
 - BTL-DSSD presenta un aumento en la máxima actividad relativa de 10°C en comparación a BTL-WT.
 - BTL-DSSD es más termoestable, aumentando más de 5 veces el tiempo de vida media en comparación con BTL-WT.
 - BTL-DSSD es notoriamente más activa que BTL-WT a altas concentraciones de fuerza iónica, reteniendo el 94% de su actividad a 500 mM de tampón fosfato, condición donde BTL-WT retiene solo un 57%.
- d. El catalizador modificado, BTL-DSSD, fue aplicado con éxito en la hidrolisis enantioselectiva de (4). Los cambios conformacionales producen un aumento considerable en la enantioselectividad, de un e.e. de 68% BTL-WT a más de 86% con BTL-DSSD, conservando la actividad catalítica. Esto es el primer reporte del uso ligación de 2 cisteínas permita mejorar enantioselectividad de una enzima.

Capítulo 3:

Bioconjugación de polímeros y péptidos con lipasas inmovilizadas: desarrollo de lipasas semisintéticas

1. Introducción

La modificación química es un interesante enfoque para alterar las propiedades de las proteínas mediante la introducción de fragmentos no naturales (Hackenberger y Schwarzer 2008; Sletten y Bertozzi 2009). La incorporación de polímeros o péptidos a estructuras proteicas es una técnica ampliamente difundida con diversas aplicaciones en medicina, biotecnología y nanotecnología (Haag y Kratz 2006; Foged y Nielsen 2008; Gauthier y Klok 2010).

Por ejemplo la conjugación de péptidos o proteínas con polímeros genera materiales híbridos que combina los beneficios de cada uno de sus componentes (Gauthier y Klok 2010). El caso más prominente y utilizado es la incorporación de polietilenglicol (PEG) a proteínas o péptidos. La conjugación con PEG es una estrategia bien establecida para la mejora de las propiedades en vivo de péptidos y proteínas terapéuticas. Mediante esta estrategia es posible mejorar la estabilidad, solubilidad, biocompatibilidad e inmunogenicidad, etc (Roberts et al. 2002). Otro ejemplo interesante de bioconjugación, es la incorporación de péptidos permeabilizantes a diferentes macromoléculas o carriers. Los péptidos permeabilizantes actúan como vectores que permiten la vehiculación intracelular a través de la membrana celular (Foged y Nielsen 2008).

Del mismo modo la modificación específica de proteínas ha permitido la alteración de las propiedades catalíticas de distintas enzimas creando nuevos catalizadores más activos y/o selectivos (Díaz-Rodríguez y Davis 2011). En literatura existen diversos ejemplos de mejora de las propiedades catalíticas de enzimas, lo que demuestra la utilidad de esta estrategia (DeSantis y Jones 1999; Qi et al. 2001; Tann et al. 2001; Davis 2003; Díaz-Rodríguez y Davis 2011).

Las lipasas no son la excepción y han sido modificadas químicamente mediante diversas estrategias como: aminación química (Palomo et al. 2007), incorporación de polímeros (Godoy et al. 2010), mímicos de líquidos iónicos (Jia et al. 2013), entre otros (Cowan y Fernandez-Lafuente 2011). Pese a los diversos ejemplos publicados, hasta el momento poca atención se ha centrado en uno de los aspectos fundamentales y particulares de las lipasas, el lid. Considerando los cambios conformacionales durante la activación interfacial de las lipasas, es posible modificar las propiedades catalíticas de la enzima modulando el equilibrio entre las formas cerradas y abiertas (Palomo 2008).

Una gran variedad de métodos para la modificación química de proteínas han sido descrito (Hermanson 2008). Uno de los métodos más conveniente y ampliamente difundido es la modificación específica de la cisteína. La cisteína posee interesantes características que la hacen una conveniente blanco para la modificación específica de proteínas: una cadena lateral de fuerte carácter nucleofílico y una relativa baja abundancia, especialmente en la superficie de la proteína. Sumado a esto, mediante métodos estándares de mutagénesis dirigida es posible construir mutantes con una única cisteína

virtualmente en cualquier posición de la proteína, sin afectar significativamente la estructura y función de esta (Chalker et al. 2009; Chalker et al. 2011).

Otra característica muy importante de la cisteína es su versatilidad química, ya que pueden reaccionar con diferentes reactivos. Entre la gran gama de reactivos con los que la cisteína reacciona, los disulfuros están involucrados en otorgar estabilidad estructural a las proteínas y están íntegramente relacionados con los procesos de regulación redox de la célula (Jacob et al. 2003). La formación de disulfuros es una de las modificaciones postransduccionales más comunes, y ha sido ampliamente utilizada como una estrategia química de modificación de proteínas (Chalker et al. 2009).

En la modificación química selectiva de la cisteína en una proteína mediante intercambio disulfuro generalmente se utilizan reactivos como DTNB o 2-DPS, ya que termodinámicamente se favorece la formación del disulfuro en la proteína (Hermanson 2008). Entre las ventajas del uso de esta estrategia de ligación se puede mencionar la rápida y selectiva formación del disulfuro en medios acuosos, no son necesarios elevados excesos del reactivo. Otra ventaja es la reversibilidad del enlace disulfuro en condiciones reductivas, lo que otorga una gran versatilidad para diferentes aplicaciones. Adicionalmente, si se desea es posible mediante el uso de fosfinas orgánicas contraer el enlace disulfuro a un irreversible tioeter (Bernardes et al. 2008b). Este método ha sido aplicado exitosamente en la preparación de diversos tioeter-glicoconjugados (Bernardes et al. 2008b).

A continuación se describirá la incorporación específica de distintos polímeros y péptidos hechos a medida a diferentes mutantes de la lipasa de *B. Thermocatenolatus*. Basándose en el complejo mecanismo catalítico de las lipasas, y tomando ventaja de este se diseñaron distintos mutantes con una cisteína localizada en la zona del lid. A estas cisteínas se incorporó selectivamente diversos polímeros y péptidos hechos a medida mediante intercambio disulfuro, con la finalidad de modificar y modular las propiedades catalíticas de la lipasa. Las nuevas lipasas semisintéticas creadas a partir de esta metodología fueron caracterizadas funcional y estructuralmente, para posteriormente ser aplicadas en varias biotransformaciones de interés biotecnológico.

2. Objetivos

Crear lipasas semisintéticas con propiedades catalíticas mejoradas mediante una estrategia de modificación química dirigida y específica en fase sólida de forma altamente eficiente y selectiva.

Objetivos específicos:

De forma de cumplir con el objetivo general de este capítulo, el trabajo se diseñó y dividió en dos subcapítulo: conjugación específica con polímeros y conjugación específica con péptidos. De cada subcapítulo se desprenden los siguientes objetivos específicos:

Conjugación específica con polímeros

- a. A partir de un estudio bioinformático basado en las estructuras cristalizadas de las conformaciones abierta y cerrada de BTL y en la distribución de carga de la zona del lid, diseñar mutantes distintos mutantes con un cisteína en la zona del lid a modificar.
- b. Diseñar y sintetizar diversos polímeros iónicos, que contengan un grupo tiol para ser introducidos selectivamente en la zona del lid de la lipasa.
- c. Desarrollar una estrategia de modificación en fase sólida para la creación de conjugados lipasa-polímeros semisintéticos, mediante la química de los enlaces disulfuros.
- d. Caracterizar estructuralmente y funcionalmente los nuevos conjugados lipasa-polímeros semisintéticos.
- e. Estudio y aplicación de los diferentes conjugados lipasa-polímero en distintas biotransformaciones de importancia biotecnológica.

Modificación sitio-específica con péptidos

- a. Mediante un estudio bioinformático detallado de la estructura del lid, diseñar y sintetizar péptidos hechos a medida, que sean complementarios con la estructura de la lipasa, de forma de promover cambios conformacionales.
- b. Desarrollo de una estrategia de modificación en fase sólida para la incorporación dirigida de péptidos hechos a medida para la creación de lipasas semisintéticas.
- c. Caracterizar estructuralmente y funcionalmente los nuevos conjugados lipasa-péptidos semisintéticos.

- d. Estudiar mediante herramientas bioinformáticas, principalmente dinámica molecular, los cambios conformacionales promovidos en la estructura de la lipasa por la incorporación de los péptidos.
- e. Estudio y aplicación de los diferentes conjugados lipasa-péptidos en distintas biotransformaciones de importancia biotecnológica.

3. Materiales y Métodos

3.1. Reactivos

Octil-agarosa 6BCL y BrCN-agarosa 4BCL fue proporcionado por GE Healthcare (Suecia). Ditiotreitól (DTT), n-hidroxisuccinimida (NHS), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), etilendiamina (EDA), N-succimidina-S-acetiltoacetato (SATA), dietil-p-nitrofenilfosfato (D-pNP), Tris(dimetilamino) fosfina (HMPT), p-nitrofenol (pNPB) (1), dimetilfenilglutarico (4), fueron suministrados por Sigma. Otros reactivos y solventes fueron de grado analítico.

3.2. Mutagénesis dirigida de BTL

Todos los experimentos de mutagénesis dirigida se realizaron de forma similar a la descrita en la sección 3.2 del Capítulo 2 (pág. 38). Los primers utilizados en este capítulo se muestran a continuación en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Primers utilizados para la mutagénesis dirigida de BTL.

Mutante / Siglas	Plásmido templado	Primers ^a
C65S/C296S/A193C (BTL*-A193C)	pT1BTL2mutCys ^b	Ala/cys 193-5' 5'-GAAAGCGtgcGCTGTCGCCAG Ala/cys 193-5' 5'-CTGGCGACAGCgcaCGCTTTC
C65S/C296S/S196C (BTL*-S196C)	pT1BTL2mutCys ^b	Ser/Cys196-5' 5'- GTTGAAAGCGGCGGCTGTCGCCtgcAATGTGCCGTACAC GAGTCAAG' Ser/Cys196-3' 5'- CTTGACTCGTGTACGGCACATTgcaGGCGACAGCCGCCG CTTTCAAC
C65S/C296S/L230C (BTL*-L230C)	pT1BTL2mutCys ^b	Leu/Cys 230-5' 5'-CATTATTTTGAACGGtgcAAACG Leu/Cys 230-3' 5'-CGTTTgcaCCGTTCAAATAATG

¹ El cambio en el nucleótido para introducir la mutación se indica en minúscula

² Plásmido con mutante de BTL sin las 2 Cys nativas (Cys65 y Cys 296)

3.3. Clonaje, expresión y purificación.

Los experimentos de clonaje, expresión y purificación se realizaron como esta descrito en la sección 3.3 del Capítulo 2 (pág.43).

3.4. Inmovilización en agarosa activada con Bromuro de cianógeno (BrCN).

La inmovilización en BrCN se realizó como esta descrito en la sección 3.4 del Capítulo 2 (pág. 44).

3.5. Ensayo de actividad Enzimática (pNPB)

La actividad enzimática de cuantifico como esta descrito en la sección 3.7 del Capítulo 1 (pág. 25).

3.6. Inhibición irreversible de los catalizadores por dietil-p-nitrofenilfosfato (D-pNP)

La inhibición con D-pNP se realizó como esta descrito en la sección 3.7 del Capítulo 2 (pág. 40)

3.7. Cuantificación de grupos tioles de los catalizadores inmovilizados

La cuantificación de los tioles se realizó como esta descrito en la sección 3.8 del Capítulo 2 (pág. 45).

3.8. Preparación de los polímeros

Dextrano-aspártico-SH (Dext-COOH)

A 100 mL de una solución de dextrano aspártico de peso molecular 1.500 Da (10 mg/mL) en 5 mM de acetato de sodio pH 5.0 se añadió 16 y 9.6 mg (0.125 eq) de EDC y NHS, respectivamente. De forma similar, a una solución de A 100 mL de una solución de dextrano aspártico de peso molecular 6.000 Da (10 mg/mL) en 5 mM de acetato de sodio pH 5.0 se añadió 1.0 y 0.6 mg (0.0313 eq) de EDC y NHS, respectivamente. Para ambos polímeros, la reacción se mantuvo por 2h a 25°C para posteriormente dializar frente agua destilada. A la solución resultante se ajusta el pH, a una concentración final de 5 mM de fosfato de sodio pH 7.5. A continuación, se añadió 420 μ L (0.0625 eq) o 26 μ L (0.0156 eq) de una solución 100 mM de cisteína a los polímeros de peso molecular de 1.500 y 6.000 Da, respectivamente. La reacción se mantuvo por 2 h a 25°C y finalmente la mezcla fue extensivamente dializada.

Dextrano-amino-SH (Dext-NH₂)

A 100mL de una solución de dextrano amino de peso molecular 1.500 o 6.000 Da (10 mg/mL) en 5 mM de fosfato de sodio pH 7.5 se añadió 420 μ L (0.0625 eq) o 26 μ L (0.0156 eq) de una solución 100 mM de SATA en acetonitrilo, respectivamente. La reacción se mantuvo por 2 h a 25°C y finalmente la mezcla fue extensivamente dializada. Finalmente para desacetilar los polímeros se añadieron una solución de 100 mM clorhidrato de hidroxilamina en 10 mM acetato de sodio pH 5.5 por 30 minutos.

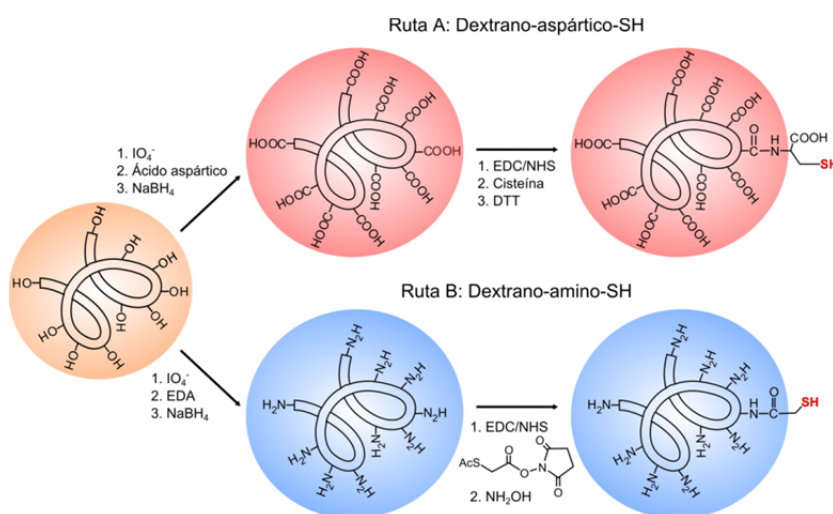


Figura 3.1. Esquema de la síntesis de los tio-polímeros utilizados.

3.9. Péptidos

Los péptidos (p1-p4, p6-p8) fueron adquiridos en Inbios (Italia). El péptido p5 fue sintetizado en fase solida usando la resina Rink y el método Fmoc (Li et al. 2008). Previo a su uso, una solución de péptido (0.5 mg/mL) fue reducido incubándolos durante 30 min en una solución de borohidruro de sodio (2 mg/mL) en 25 mM carbonato de sodio pH 10.0. Posteriormente, el pH se ajustó a 7.0 con HCl diluido para destruir el borohidruro remanente.

3.10. Protección del tiol de los distintos mutantes de BTL.

0.2 g de los distintos cisteína-mutantes de BTL (previamente inmovilizados) fueron incubados en 2 mL de una solución 50 mM de DTT en fosfato de sodio 25 mM pH 8.0, durante 30 min. Posteriormente, el biocatalizador reducido fue extensamente lavado hasta remover por completo el DTT.

A continuación, a 0.2 g del catalizador reducido se incubo en 3 mL de una solución de 2-DPS (1.5 mM 2-DPS en una mezcla de 5% v/v DMSO en 25 mM fosfato de sodio a pH 8.0) por 1 h. La activación de la cisteína fue cuantificada espectrofotométrica mediante la liberación de 2-tiopiridona a 343 nm. Todos los mutantes de BTL fueron modificados con rendimientos sobre el 95%.

3.11. Incorporación de los polímeros hechos a medida.

0.7 mL del respectiva solución de polímero fue disuelto en 2.3 mL de 500 mM fosfato de sodio con 0.5% Tritón X-100 a pH 8.0. Posteriormente se añadió 0.2 g del biocatalizador inmovilizado y previamente activado con 2-DPS. Después de 1 h, la modificación de confirmo por la liberación de 2-tiopiridona a 343 nm. A continuación el biocatalizador fue filtrado y lavado con abundante agua destilada.

3.12. Incorporación de péptidos hechos a medida.

0.7 mL del respectiva solución de péptido fue disuelto en 2.3 mL de 500 mM fosfato de sodio con 0.5% Tritón X-100 a pH 8.0. Posteriormente se añadió 0.2 g del biocatalizador inmovilizado y previamente activado con 2-DPS. Después de 1 h, la modificación de confirmo por la liberación de 2-tiopiridona a 343 nm. A continuación el biocatalizador fue filtrado y lavado con abundante agua destilada.

El mismo procedimiento se realizó con el mutante en su forma soluble (200 mL, (1 mg/mL). Una vez acoplado los péptidos, el biocatalizador fue extensamente dializado frente a agua destilada. Posteriormente fue concentrado mediante centricon (Amicon Ultra 10 kDa) y caracterizado por MALDI-TOF. Adicionalmente, fueron analizados mediante SDS-electroforesis, dicroísmo circular y fluorescencia.

3.13. Reacción de desulfuración.

1 g de los mutantes inmovilizados y modificados con los péptidos se suspendieron en una solución de 70 mM de tampón CAPS pH 9.5 con 15 mM de Tris(dimetilamino)fosfina (HMPT), incubandolos durante 16 horas. Posteriormente se filtra y lava con abundante agua destilada.

3.14. Espectrometría de masas (MALDI-TOF-MS)

El espectro de MALDI-MS de los distintos mutantes y los conjugados con péptidos fueron registrados en un Bruker MicroFlex (Bruker Daltonics), utilizando Ácido sinapico como matrix. 5 μ L de la muestra de proteína (1 mg/mL) fue mezclada con 5 μ L de una solución saturada de ácido sinapico (70/30: agua/acetonitrilo con 0.1% TFA). La mezcla (1 μ L) fue pipeteada sobre la placa y secada a temperatura ambiente.

3.15. Espectrometría de Fluorescencia

Los espectros de fluorescencia se realizaron como esta descrito en la sección 3.11 del Capítulo 1 (pág. 26).

3.16. Espectrometría de Dicroísmo Circular (DC)

Los espectros de DC se realizaron como esta descrito en la sección 3.10 del Capítulo 1 (pág. 25).

3.17. Determinación de los parámetros cinéticos de mutantes los conjugados lipasa-péptidos.

La determinación de las constantes cinéticas (k_{cat} y K_m) de los diferentes conjugados de BTL se llevó a cabo midiendo la velocidad inicial en la hidrólisis de pNPB a distintas concentraciones (0.1 -1.2 mM) en 25 mM de tampón fosfato sódico a pH 7.0 y 25°C. Los valores de las constantes se obtuvieron utilizando el método de Lineweaver-Burke.

3.18. Hidrólisis de timidina per-acetilada.

El sustrato 8 (0.5 mM) fue disuelto en 10 mM de tampón fosfato sódico pH 7.0 o 10 mM de tampón acetato de sodio pH 5.0, respectivamente. Posteriormente a 0.25 g de los catalizadores inmovilizados se añadió 5 mL de la solución del sustrato, manteniéndolas a 25°C y agitación constante. Se analizó la conversión mediante HPLC en fase reversa (Spectra Physic SP 100 acoplado a un detector UV Spectra Physic SP 8450). Se empleó una columna Kromasil C18 (25x0.4 cm) suministrada por Análisis Vínicos. Como fase móvil se usó el siguiente programa con gradiente: A: mezcla de 35% de acetonitrilo en tampón fosfato de amonio 10 mM pH 4.2; B: mezcla de 10% de agua miliQ; 0-6 min 100% A; 6-14 min 85% A-15% B, 14-22 min 100% A; flujo de 1 mL/min. La detección UV se realizó a 260 nm. Una unidad internacional de actividad se definió como la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 1 μ mol del sustrato por minuto (IU) bajo las condiciones descritas anteriormente. Los tiempos de retención fueron 2.4 min para Timidina (8c), 9.4 min para (8a), 10.2 min para (8b) y 19 min para (8).

3.19. Hidrólisis de glucal per-acetilado.

El sustrato 9 (2.0 mM) fue disuelto en 10 mM de tampón acetato de sodio pH 5.0. Posteriormente a 0.25 g de los catalizadores inmovilizados se añadió 5 mL de la solución del sustrato, manteniéndolas a 25°C y

agitación constante. Se analizó la conversión mediante HPLC en fase reversa (Spectra Physic SP 100 acoplado con un detector UV Spectra Physic SP 8450). Se empleó una columna Kromasil C18 (25x0.4 cm) suministrada por Análisis Vénicos. Como fase móvil se utilizó una mezcla isocrática de 30% de acetonitrilo en 10 mM tampón amonio fosfato a un pH final de 3.0 a un flujo de 1 mL/min. La detección UV se realizó a 220 nm. Una unidad internacional de actividad se definió como la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 1 μ mol del sustrato por minuto (IU) bajo las condiciones descritas anteriormente. Los tiempos de retención fueron 5.1 y 18 minutos para (9a) y (9) respectivamente.

3.20. Hidrolisis enzimática de dimetilfenilglutarato.

La hidrolisis y la cuantificación de (4) se realizaron como esta descrito en la sección 3.14 del Capítulo 1 (pág. 27).

4. Resultados

Como se ha mencionado anteriormente, el presente capítulo se divide en dos subcapítulos: conjugación de lipasas con polímeros y conjugación de lipasas con péptidos.

4.1. Conjugación con polímeros

a. Estudio bioinformático y diseño de los mutantes

La lipasa BTL tiene la particularidad de sufrir un gran cambio conformacional entre sus formas cerradas y abiertas (Carrasco-Lopez et al. 2009). Este cambio conformacional involucra el movimiento de más de 70 aminoácidos, pertenecientes a la zona del lid de la lipasa. Tomando ventaja de esto, se propuso la creación de variantes de BTL con una sola cisteína en la zona del lid, para su posterior conjugación sitio específico.

Basándose en estudios informáticos utilizando la estructura abierta de la enzima (Carrasco-Lopez et al. 2009) y la distribución de la cargas de los aminoácidos presentes en el lid (Baker et al. 2001), se seleccionaron 2 posiciones para ser mutadas: Ala193 (en el lid 1) y Leu230 (en el lid 2), ver Figura 3.2.

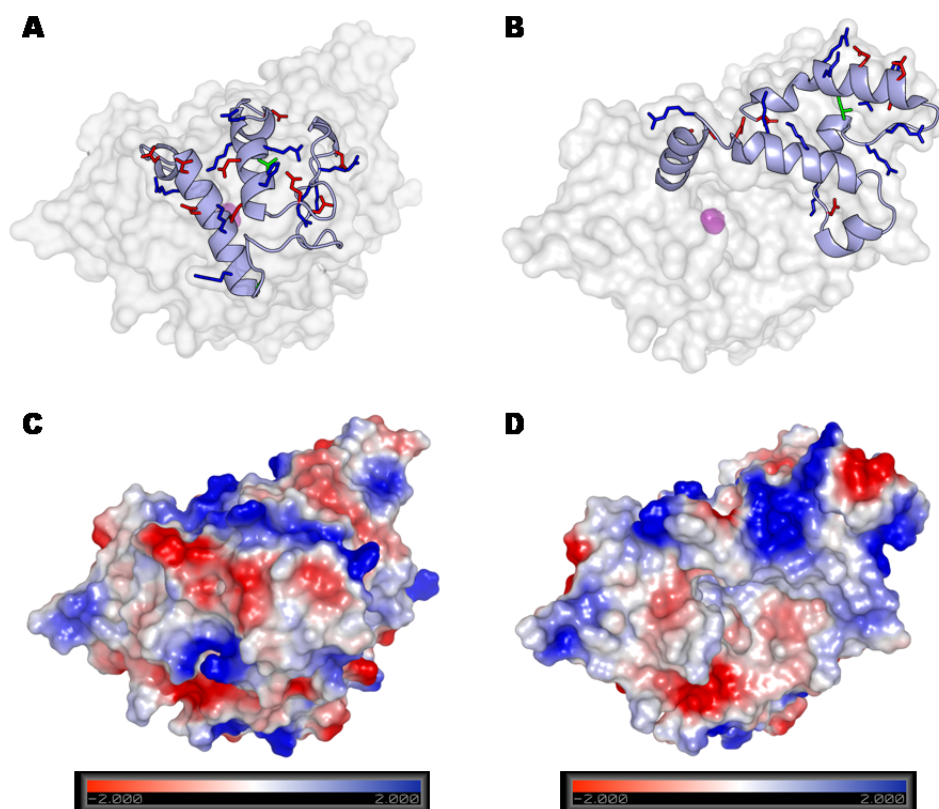


Figura 3.2. Comparación de las estructuras cristalizadas de BTL en sus dos conformaciones: cerrada (A) y abierta (B). Ala193 y Lue230 se marcan en verde, los aminoácidos cargados se marcan en rojo (negativos) y en azul (positivos). Adicionalmente se muestra la representación del potencial electrostático de la superficie de las estructuras de BTL en su conformación cerrada (C) y abierta (D)

En la Figura 3.2A y B se muestra el potencial electrostático de la superficie de la proteína en sus dos conformaciones, observando se grandes diferencias de potencial entre estas. Apoyándose en este punto, se decide la incorporación sitio dirigida de distintos polímeros iónicos (de distinto tamaño y carga electrostática).

La lipasa BTL nativa (BTL-WT) contiene en su estructura 2 cisteínas (Cys65 y Cys296) las cuales son sustituidas por serinas para crear un mutante sin cisteínas (BTL-C65S/C296S, por simplificación BTL*). Sobre este mutante se incorporan las cisteínas en la zona del lid (BTL-C65S/C296S/A193C y BTL-C65S/C296S/L230C, por simplificación BTL*-A193C y BTL*-L230C, respectivamente). Todos los mutantes seleccionados y BTL-WT fueron expresados en *E.coli*, purificados e inmovilizado en BrCN-agarosa sin diferencias significativas.

b. Incorporación dirigida de los polímeros

La cisteína de los distintos mutantes previamente inmovilizados en BrCN-agarosa de BTL fueron protegidos utilizando 2-PDS para evitar oxidación y permitir la posterior modificación (Figura 3.3). Primero los mutantes de BTL inmovilizados fueron incubados en una solución 1.5 de 2-DPS a pH 8.0, siguiendo la modificación por espectrofotometría a 343 nm, obteniéndose un rendimiento sobre el 95%.

Una vez protegidos los diferentes variantes de BTL fueron modificados con una serie de tiol-polímeros hechos a medida. La incorporación de los polímeros fue cuantificada espectrofotométricamente mediante la liberación de 2-tiopiridona a 343 nm. Después de una 1 hora de incubación, se obtuvieron rendimientos cuantitativos para todos los casos.

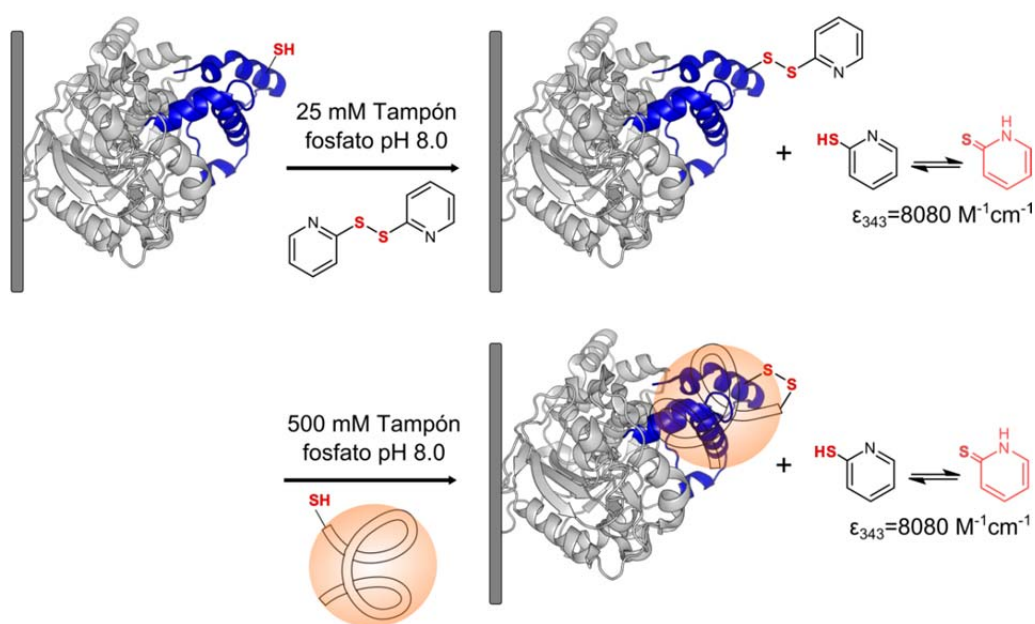


Figura 3.3. Esquema de la conjugación sitio específica de lipasa y polímeros

Adicionalmente, la variante sin cisteínas (BTL*) fue sometida al mismo tratamiento para confirmar que la modificación involucrara solo el grupo tiol del polímero. Los resultados mostraron que este mutante no pudo ser modificado con ninguno de los polímeros.

C. Efecto sobre la actividad de la incorporación de polímeros en el lid.

El efecto de la modificación de los distintos variantes de BTL utilizando diferentes polímeros (diferente tipo y tamaño) sobre la actividad específica de la lipasa frente a pNPB se muestra en la Figura 3.4.

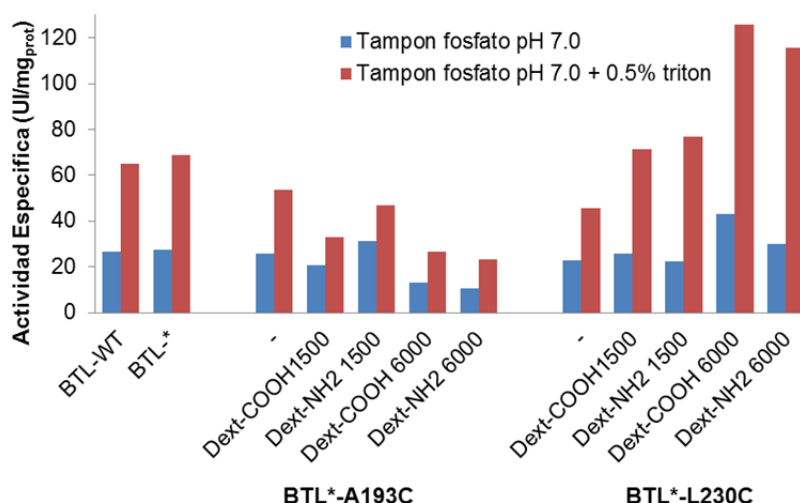


Figura 3.4. Actividad específica de los distintos conjugados lipasa-polímeros a pH 7.0 en presencia y ausencia de detergente

Podemos observar que BTL*-A193C mantiene una actividad específica similar que BTL-WT y BTL*. Así mismo, la modificación de BTL*-A193C con Dext-COOH 1500 promueve un ligero incremento sobre la actividad específica (de un 18%). La modificación de este variante con otros polímeros causa una caída considerable en la actividad (hasta un 78-40%).

En el caso de la otra variante, BTL*-L230C, la mutación produce una pequeña disminución en la actividad, pero la incorporación de cualquiera de los polímeros estudiados mejora la actividad. El mayor incremento se logra con la incorporación de Dext-COOH 6000 (1.6 veces).

A su vez, se estudió la incorporación de polímeros de Dext-COOH 20000, pero en todos los casos se produjo una gran disminución en la actividad específica. Probablemente, la incorporación de polímeros de gran tamaño promueva fuertes impedimentos estéricos.

De forma paralela, para investigar el efecto de la incorporación de un polímero sobre el mecanismo de activación interfacial de la lipasa, se cuantificó la actividad de hidrólisis de pNPB en presencia de 0.5% triton-X100 (Figura 3.5). BTL-WT y BTL* se hiperactivaron alrededor de 2.5 veces en presencia de estas concentraciones de triton-X100, ya que este estabiliza la forma abierta de la lipasa (Godoy et al. 2011a). Ambos mutantes, BTL*-A193C y BTL*-L230C, presentaron una hiperactivación similar.

La hiperactivación mostrada por BTL*-A193C modificada con polímeros fue similar o incluso menor que la proteína sin modificar. Sin embargo, la modificación química sitio dirigida sobre BTL*-L230C produce una fuerte hiperactivación de la lipasa en presencia de detergente. En particular, BTL*-L230C-Dext-NH₂ 6000 mostró la mayor hiperactivación (aprox. 4 veces).

Todos estos resultados, tanto de actividad como de hiperactivación, muestran que la incorporación específica de polímeros en la zona del lid de una lipasa altera el movimiento natural de apertura y cierre, posiblemente causado por una reestructuración conformacional del lid.

d. Efecto de la incorporación de polímeros sobre la inhibición irreversible con D-pNP

Con la finalidad de evaluar el efecto de la incorporación de los polímeros en la superficie de la lipasa sobre el mecanismo catalítico, se estudió la inhibición irreversible con D-pNP de los diferentes conjugados. Se puede observar en la Figura 3.5, que después de la incorporación de los polímeros se produce una disminución en la actividad más rápida.

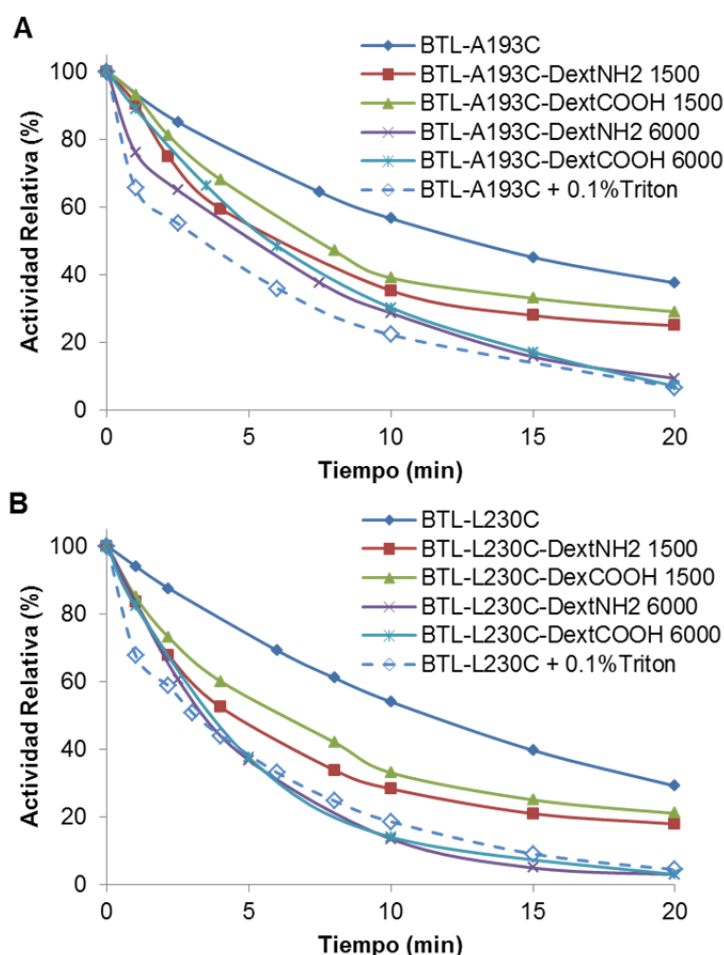


Figura 3.5. Inhibición irreversible con D-pNP de los diferentes conjugados de BTL. Variantes de BTL*-A193C (A) y variantes de BTL*-L230C (B)

Podemos observar que después de 10 minutos, el variante BTL*-A193C conservó el 57% de la actividad inicial, sin embargo BTL*-A193C-DextNH₂ 6000 retuvo solo un 29% de la actividad. Cuando la inhibición se realizó en presencia de 0.5% de tritón (condición donde el equilibrio conformacional de la lipasa se encuentra desplazado hacia la forma abierta), BTL*-A193C conserva el 22% de la actividad después de 10 minutos (Figura 3.5A). Para la variante BTL*-L230C obtuvieron resultados similares a los obtenidos con BTL*-A193C (Figura 3.5B).

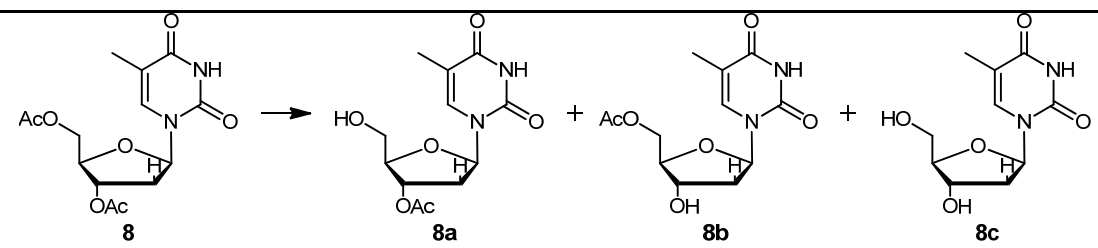
Estos resultados podría indicar que después de la incorporación de los polímeros, se favorece la una estructura más abierta de la proteína. Además podemos observar que el tamaño del polímero tiene una influencia. La modificación con polímeros de alto peso molecular (6000 Da) promueven una inhibición más rápida.

Por lo tanto, parece que la modificación química con polímeros favorece una mayor exposición al medio de la Ser catalítica, causado posiblemente por diferentes cambios estructurales en la región del lid. Es muy probable que estos cambios promuevan una forma abierta de la enzima (Godoy et al. 2010; Romero et al. 2012).

e. Efecto de la incorporación de polímeros sobre las propiedades catalíticas y la aplicación biotecnológica de las nuevas enzimas semisintéticas

A continuación se procedió a investigar los posibles cambios en las propiedades catalítica, especialmente sobre la regio y enantioselectividad, de las nuevas lipasas semisintéticas. Con esta finalidad, las nuevas enzimas fueron utilizadas dos biotransformaciones muy interesantes, de gran potencial biotecnológico como son: la deprotección regioselectiva de timidina per-*O*-acetilada (8) y la desimetrización del diester del ácido dimetilfenilglutarico (4). En el caso del primer sustrato (8), así como otros análogos de nucleósidos tienen un gran interés en medicina donde son utilizados como antitumorales y antivirales (Galmarini et al. 2002; Herdewijn 2008), como por ejemplo Zidovudine utilizado en el tratamiento del VIH/SIDA (Esté y Cihlar 2010). Referente al diester del ácido dimetilfenilglutarico (4), un importante número de fármacos contienen 3-arilglutaric como estructura base, (-)-paroxetine, (R)-baclofen, entre otros (Cabrera y Palomo 2011).

En una primera instancia los distintos variantes de BTL fueron probados en la hidrólisis de 8 a pH 7.0. Ambos mutantes, BTL*-A193C y BTL*-L230C, muestran un pequeño incremento en la actividad y regioselectividad hacia la producción de 3'-*O*-acetiltimidina (8a) en comparación con BTL-WT y BTL*. La incorporación de Dext-COOH 6000 y Dext-NH₂ 6000 en BTL*-A193C produce un incremento en la actividad de 2.5 y 3 veces, respectivamente. Además, el mutante BTL*-A193C modificado con Dext-NH₂ 6000 muestra un incremento significativo en la regioselectividad, alcanzando rendimientos de (8a) de un 89%.

Tabla 3.2. Hidrolisis regioselectiva de timidina per-acetilada con los diferentes biocatalizadores a pH 7.0


Biocatalizador	Modificación	Actividad ^a	Tiempo [h]	Rendimiento ^b		
				8a [%]	8b [%]	8c [%]
BTL-WT	-	0.55	80	59	8	33
BTL*	-	0.65	70	51	5	44
BTL*-A193C	-	0.64	93	79	8	13
BTL*-A193C	Dext-COOH 1.500	0.59	93	75	7	18
BTL*-A193C	Dext-NH ₂ 1.500	0.66	93	78	6	16
BTL*-A193C	Dext-COOH 6.000	1.38	93	72	3	25
BTL*-A193C	Dext-NH ₂ 6.000	1.64	93	89	2	9
BTL*-L230C	-	0.77	57	62	13	25
BTL*-L230C	Dext-COOH 1.500	0.7	48	72	10	18
BTL*-L230C	Dext-NH ₂ 1.500	0.49	72	37	16	47
BTL*-L230C	Dext-COOH 6.000	0.15	144	52	23	25
BTL*-L230C	Dext-NH ₂ 6.000	0.26	132	76	15	9

^a Actividad específica definida como $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g} \times 10^{-5}$ ^b Rendimiento del producto a 100% de conversión

Sin embargo, la modificación en el variante mutado Cys230 no produce mejores resultados, tanto en la actividad como en la regioselectividad. La variante BTL*-L230C-Dext-COOH 6000 muestra una disminución en la actividad de más de 3.5 veces y BTL*-L230C-Dext-NH₂ 1500 genera el valor de regioselectividad más bajo (37% de 8a).

Con la finalidad de estudiar el efecto del pH sobre la actividad y selectividad de los catalizadores, el pH de la reacción se disminuyó a 5.0. Los resultados muestran significantes e interesantes diferencias (Tabla 3.3). Podemos observar que BTL-WT y BTL-* se muestran alrededor de un 30% menos activos a pH 5.0 que a pH 7.0, pero a su vez ligeramente más regioselectivos. Los cambios más interesantes se obtienen con el mutante BTL*-L230C. La incorporación específica de Dext-COOH 1500 y Dext-NH₂ 1500 produjeron un incremento sobre la actividad de 4.6 y 6.0 veces, en comparación con BTL-WT. Así mismo estas nuevas proteínas semisintéticas mostraron la mejor regioselectividad encontrada a estas condiciones, 84 y 80% de (8a), respectivamente.

Tabla 3.3. Hidrolisis regioselectiva de timidina per-acetilada con los diferentes biocatalizadores a pH 5.0

Biocatalizador	Modificación	Actividad ^a	Tiempo [h]	Rendimiento ^b		
				8a [%]	8b [%]	8c [%]
BTL-WT	-	0.37	96	65	6	29
BTL*	-	0.43	80	70	4	26
BTL*-A193C	-	0.77	72	91	3	6
BTL*-A193C	Dext-COOH 1.500	0.86	72	89	4	7
BTL*-A193C	Dext-NH ₂ 1.500	0.80	72	90	3	7
BTL*-A193C	Dext-COOH 6.000	1.04	58	92	3	5
BTL*-A193C	Dext-NH ₂ 6.000	0.85	72	92	4	4
BTL*-L230C	-	0.55	69	67	8	25
BTL*-L230C	Dext-COOH 1.500	1.78	55	84	5	11
BTL*-L230C	Dext-NH ₂ 1.500	2.32	55	80	5	15
BTL*-L230C	Dext-COOH 6.000	0.07	216	74	19	7
BTL*-L230C	Dext-NH ₂ 6.000	0.11	264	76	16	8

^a Actividad específica definida como $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g} \times 10^{-5}$ ^b Rendimiento del producto a 100% de conversión

La variante BTL*-A193C muestra la más alta regioselectividad a pH 5.0, con un rendimiento de 8a del 91%. La modificación de este mutante con Dext-COOH 6000 incrementa la actividad cerca de un 35% sin perjuicio sobre la regioselectividad (92% de 8a).

Como segundo punto, se estudió el comportamiento de los nuevos catalizadores en la desimetrización del diéster del ácido dimetilfenilglutarico (4) a pH 7.0 y 5.0.

Los resultados se muestran en las Tablas 3.4 y 3.5. En estas podemos observar que los dos mutantes monocisteína de BTL muestran un exceso enantiomérico (e.e.) mayor que BTL-WT y BTL*.

En la hidrolisis de 4 a pH 7.0, cuando BTL*-A193C fue modificado con Dext-COOH₂ 6000 se observa un incremento en la actividad de 3.5 veces. Asimismo, la modificación de este mutante con DextNH₂ 1500 produce un incremento en la enantioselectividad (87% e.e.). Sin embargo, el mejor resultado se obtiene con la incorporación selectiva de DextNH₂ 6000, la actividad se incrementa en más de 5 veces y este variante cataliza la reacción con un excelente exceso enantiomérico (>99%).

La incorporación de la cisteína en la posición 230 produce una variante de la enzima más activa y selectiva (BTL*-L230C) en la hidrolisis de (4) a pH 7.0 (93% e.e.). Sin embargo, ninguna de las modificaciones químicas con polímeros logra mejorar este resultado. La modificación de BTL*-L230C con Dext-COOH 1500, Dext-NH₂ 1500 y Dext-NH₂ 6.000 mostró una enantioselectividad similar pero una actividad menor.

Tabla 3.4. Hidrólisis enantioselectiva de dimetilfenilglutarico con los diferentes biocatalizadores a pH 7.0

4 **(S)-4b**

Biocatalizador	Modificación	Actividad ^a	Tiempo (h)	Conv ^b (%)	Rendimiento ^c (%)	e.e ^d (%)
BTL-WT	-	8.48	196	48	42	68
BTL *	-	7.61	196	28	23	64
BTL*-A193C	-	0.53	186	23	15	78
BTL*-A193C	Dext-COOH 1500	0.48	186	12	1	n.d ^e
BTL*-A193C	Dext-NH ₂ 1.500	0.59	186	26	17	87
BTL*-A193C	Dext-COOH 6.000	1.86	96	43	18	60
BTL*-A193C	Dext-NH ₂ 6.000	2.76	96	64	20	>99
BTL*-L230C	-	11.3	96	65	38	93
BTL*-L230C	Dext-COOH 1500	3.41	72	49	16	93
BTL*-L230C	Dext-NH ₂ 1.500	1.98	63	29	10	94
BTL*-L230C	Dext-COOH 6.000	1.43	96	33	17	57
BTL*-L230C	Dext-NH ₂ 6.000	0.99	96	23	18	92

^a Actividad específica definida como $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}_{\text{prot}} \times 10^{-5}$ ^b Conversión de 4 (%)^c Rendimiento de 10 a la conversión indicada^d Determinado entre 10-15% de conversión mediante HPLC Quiral^e No determinado

Cuando la reacción fue realizada a pH 5.0, BTL*-L230C muestra un pequeño aumento tanto en la actividad y enantioselectividad (Tabla 3.5).

Mediante la modificación específica de dos variantes de BTL con diferentes polímeros hechos a medida se ha obtenido una pequeña biblioteca de nuevos biocatalizadores. Estos nuevos biocatalizadores muestran mejoras tanto en actividad como en regio y enantioselectividad en dos importantes biotransformaciones.

Esta estrategia representa una rápida, simple y eficiente metodología para crear biocatalizadores con excelentes propiedades catalíticas, que pueden ser utilizadas para la producción de importantes intermediarios utilizados en la síntesis de compuestos farmacéuticos.

Tabla 3.5. Hidrólisis enantioselectiva de dimetilfenilglutarico con los diferentes biocatalizadores a pH 5.0

Biocatalizador	Modificación	Actividad ^a	Tiempo (h)	Conv ^b (%)	Rendimiento ^c (%)	e.e ^d (%)
BTL-WT	-	6.77	196	32	29	72
BTL *	-	4.88	196	23	21	82
BTL *-A193C	-	2.74	48	32	26	82
BTL *-A193C	Dext-COOH 1500	2.22	48	26	26	45
BTL *-A193C	Dext-NH ₂ 1.500	2.88	48	33	25	75
BTL *-A193C	Dext-COOH 6.000	0.74	96	17	7	87
BTL *-A193C	Dext-NH ₂ 6.000	0.81	96	19	13	96
BTL *-L230C	-	13.4	96	62	12	96
BTL *-L230C	Dext-COOH 1500	5.47	72	85	67	94
BTL *-L230C	Dext-NH ₂ 1.500	6.2	146	36	27	96
BTL *-L230C	Dext-COOH 6.000	0.37	192	18	8	79
BTL *-L230C	Dext-NH ₂ 6.000	0.3	192	14	8	77

^a Actividad específica definida como $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}_{\text{prot}} \times 10^{-5}$ ^b Conversión de 4 (%)^c Rendimiento de 10 a la conversión indicada^d Determinado entre 10-15% de conversión mediante HPLC Quiral

4.2. Conjugación con péptidos

A partir de los buenos resultados obtenidos con los conjugados polímeros-lipasa, se planteó una segunda estrategia de modificación, más específica y elegante: la creación de lipasas semisintéticas mediante su conjugación con péptidos.

a. Estudio bioinformático y diseño de los mutantes y péptidos

Como se ha mencionado anteriormente, la lipasa BTL posee varias particularidades estructurales, siendo una de estas es la complejidad de su lid conformado por 2 cadenas α -hélices. Basándose en esto, la idea fue introducir una única cisteína en diferentes posiciones de este lid, para posteriormente introducir selectivamente un péptido hecho a medida.

Mediante el estudio bioinformático, utilizando la estructura abierta de la proteína, se seleccionaron 3 posiciones para ser mutadas: Ala193 (en el lid interno), Leu230 (en el lid externo) y Ser196 (entre ambos lid). Además, se estudió la composición aminoacídica de ambos lid, observándose que el primer lid está compuesto principalmente por aminoácidos con residuos catiónicos (Lys187 y Lys191). En cambio el segundo lid se encuentra compuesto principalmente por aminoácidos de naturaleza hidrofóbica (Trp 236, Phe227, Tyr226 y Phe230) (Figura 3.6).

Tomando en cuenta estas composiciones aminoacídica del lid, se diseñaron 2 péptidos: Ac-Cys-Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-CONH₂ (p1) y Ac-Cys-(Asp)₄-Asp-COOH (p2). El objetivo fue que los péptidos fuesen complementarios con la estructura de la proteína, de esta forma BTL*-A193C se modificará con p1, BTL*-L230C con p2 y BTL*-S196C con ambos péptidos (p1 y p2) (ver Figura 3.6).

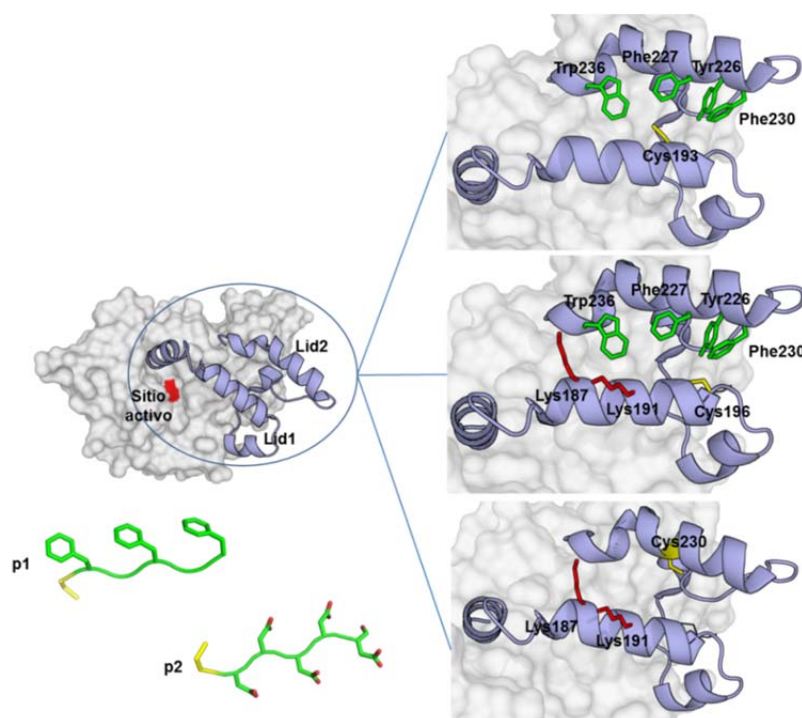


Figura 3.6. Esquema de la composición aminoacídica del lid de BTL

b. Preparación del catalizador y caracterización estructural y cinética de los conjugados

Los tres mutantes de BTL, BTL*-A193C, BTL*-S196C, BTL*-L230C, fueron expresados en *E.coli*, purificados e inmovilizados en BrCN-agarosa sin diferencias significativas con BTL-WT y BTL-*. Todos los mutantes fueron inmovilizados con una carga enzimática de 5 mg de lipasa/g de soporte, y en todos los casos se obtuvieron rendimientos por sobre el 95%. Una vez inmovilizados los mutantes de BTL fueron modificados específicamente, de forma similar a la conjugación con polímeros, ver Figura 3.7.

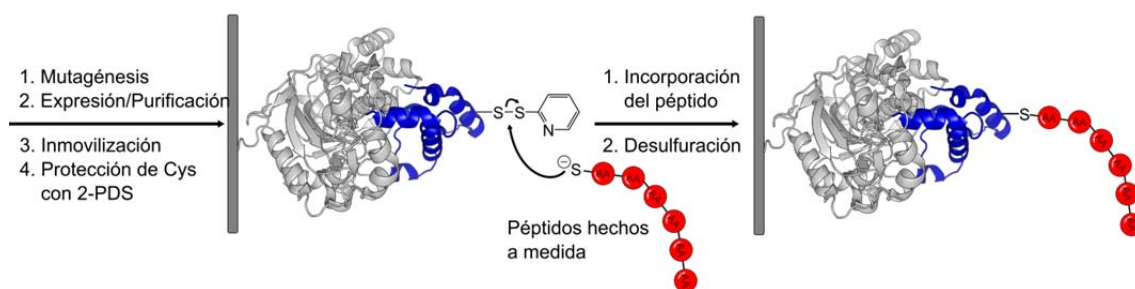


Figura 3.7. Esquema de la conjugación sitio específica de lipasa y péptidos

La reacción de acoplamiento de los péptidos se realizó en agua a pH 8.0. Posterior a la acoplamiento del péptido, se realizó una reacción de desulfuración para formar un enlace tioéter irreversible entre el péptido y la proteína (ver Figura 3.7). Se obtuvo un rendimiento cuantitativo de conversión, cuantificado mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF) (ver Figura 3.8). Además, no se observó modificación de BTL* después de similar tratamiento con los péptidos.

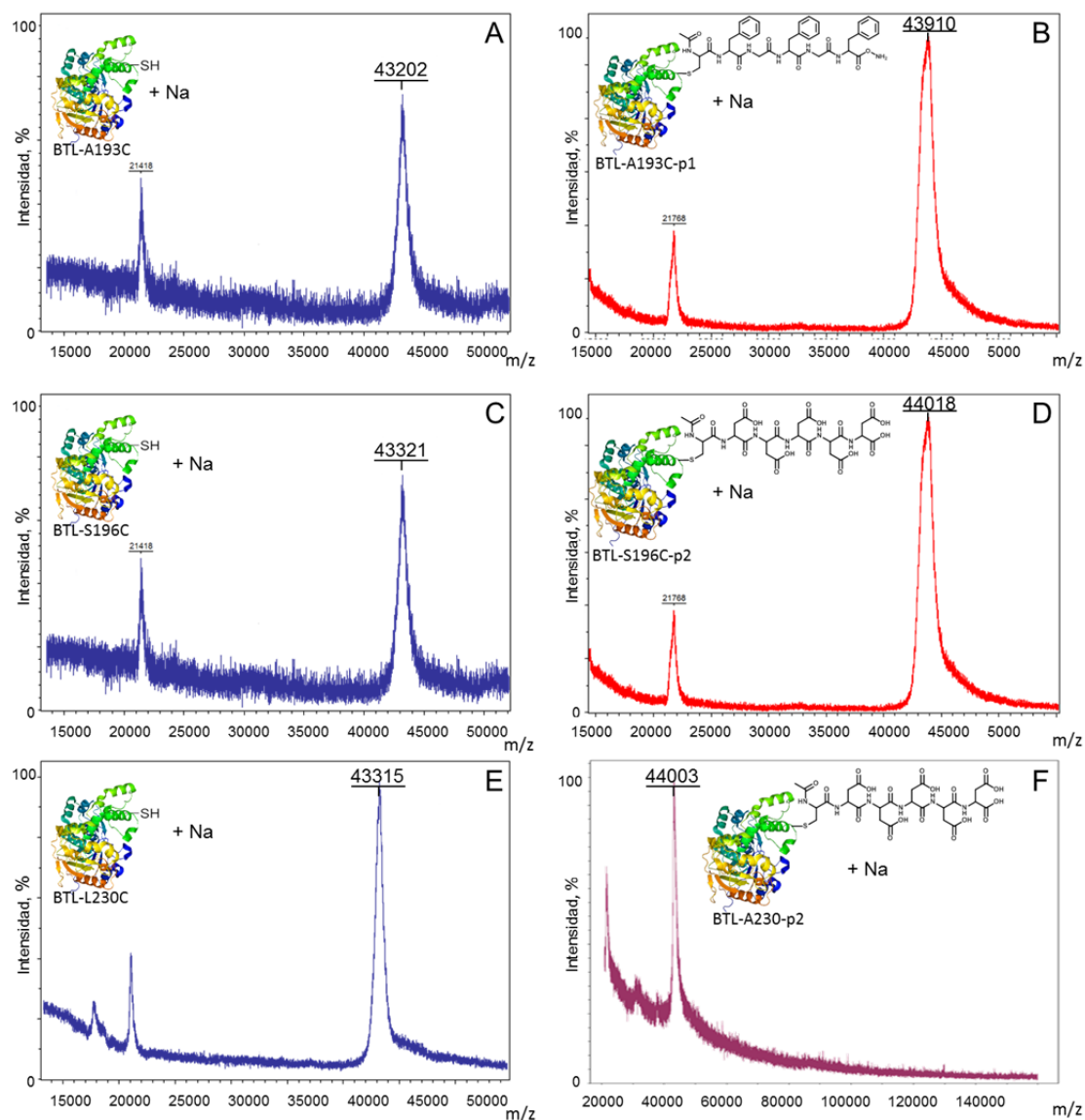


Figura 3.8. Espectro de masas (MALDI-MS) de los mutantes y conjugados: A) BTL*-A193C, B) BTL*-A193C-p1, C) BTL*-S196C, D) BTL*-S196C-p2, E) BTL*-L230C, F) BTL*-L230C-p2

C. Preparación del catalizador y caracterización estructural y cinética de los conjugados

A continuación se realizaron distintos estudios, para ver la implicancia de la introducción de los péptidos sobre la estructura de la proteína. Como primer punto, mediante dicroísmo circular (DC) se pudo observar que la incorporación de un péptido en el lid de la lipasa produce una fuerte caída en la elipticidad molar entre los 210-240 nm. Esto confirma que el péptido afecta la estructura secundaria de la enzima con un incremento de las α -hélices después de la modificación. Esto se observó para los 3 mutantes modificados con péptidos (Ver Figura 3.9).

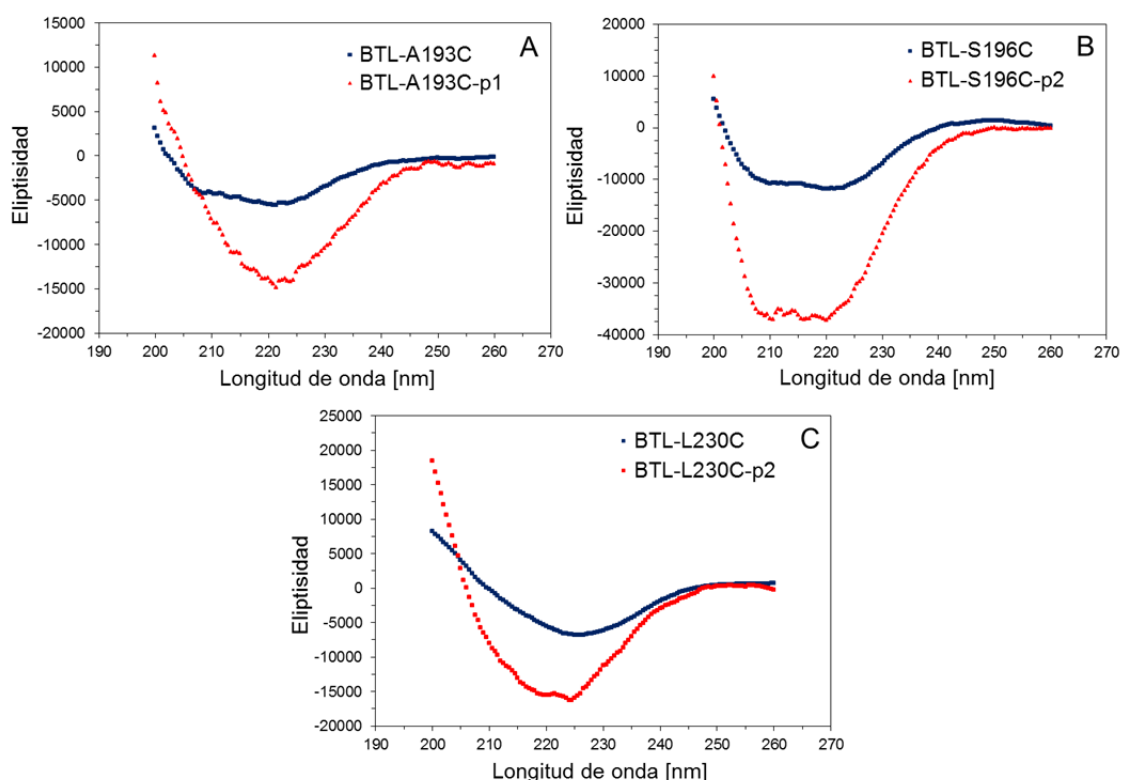


Figura 3.9. Espectros de dicroísmo circular de BTL y sus conjugados: A) BTL*-A193C; B) BTL*-S196C y C) BTL*-L230C

Así mismo, mediante espectrometría de fluorescencia se estudió el efecto del péptido sobre la estructura de la lipasa (Figura 3.10). Se puede observar que para el caso de los conjugados BTL*-A193C-p1 y BTL*-L230C-p2 se produce una disminución en la intensidad de la fluorescencia, caso contrario ocurre con el conjugado BTL*-A196C-p2. A su vez, en ninguno de los 3 conjugados se observa un cambio significativo en la λ_{max} . Como se ha discutido en los capítulos anteriores, posiblemente la inserción del péptido produce una reorganización de los aminoácidos, específicamente los triptófanos en el lid. Se puede apreciar que los cambios conformacionales producidos son dependientes del péptido y de la posición donde este es insertado, lo que conlleva a la creación de biocatalizadores estructuralmente diferentes.

De forma complementaria se realizó la inhibición irreversible con D-pNP de los mutantes y diferentes conjugados. Como se observa en la Figura 3.11, todos los conjugados muestran una inhibición más rápida que el mutante correspondiente previa incorporación del péptido. Sin embargo, todos los conjugados muestran una inhibición ligeramente más lenta que el mutante en presencia de tritón (forma abierta de la lipasa).

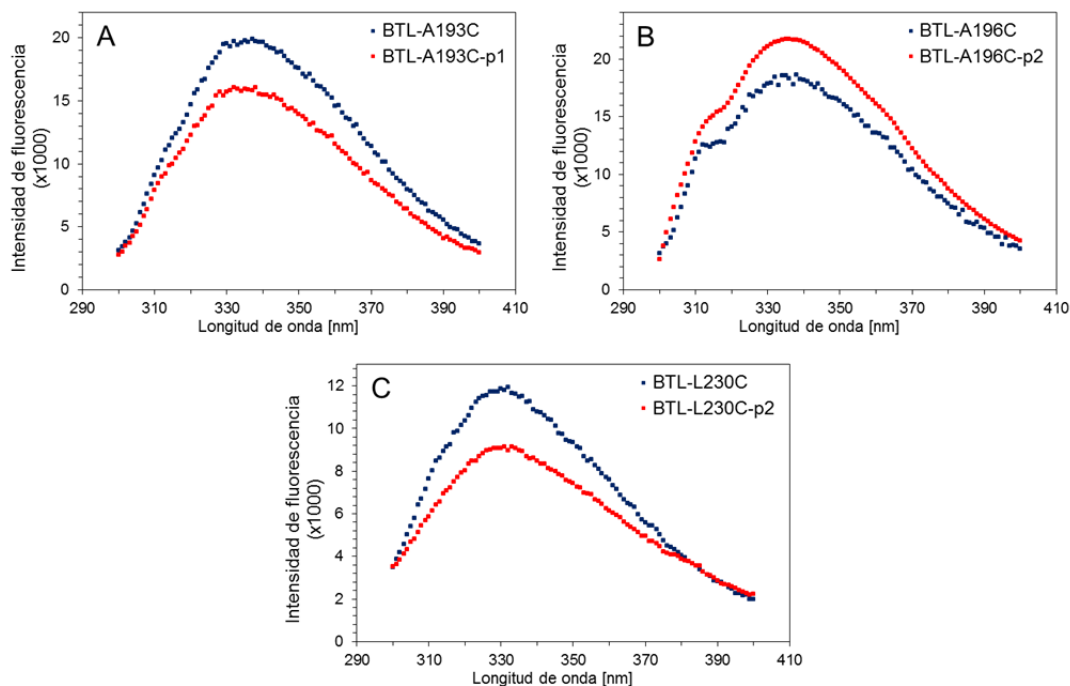


Figura 3.10. Espectros de fluorescencia de los de BTL y sus conjugados: A) BTL*-A193C; B) BTL*-S196C y C) BTL*-L230C

Esto implicaría que todos nuevos conjugados lipasa-péptido muestran que un desplazamiento del equilibrio conformacional hacia la forma abierta, aunque no alcanzan las exactas propiedades de esta.

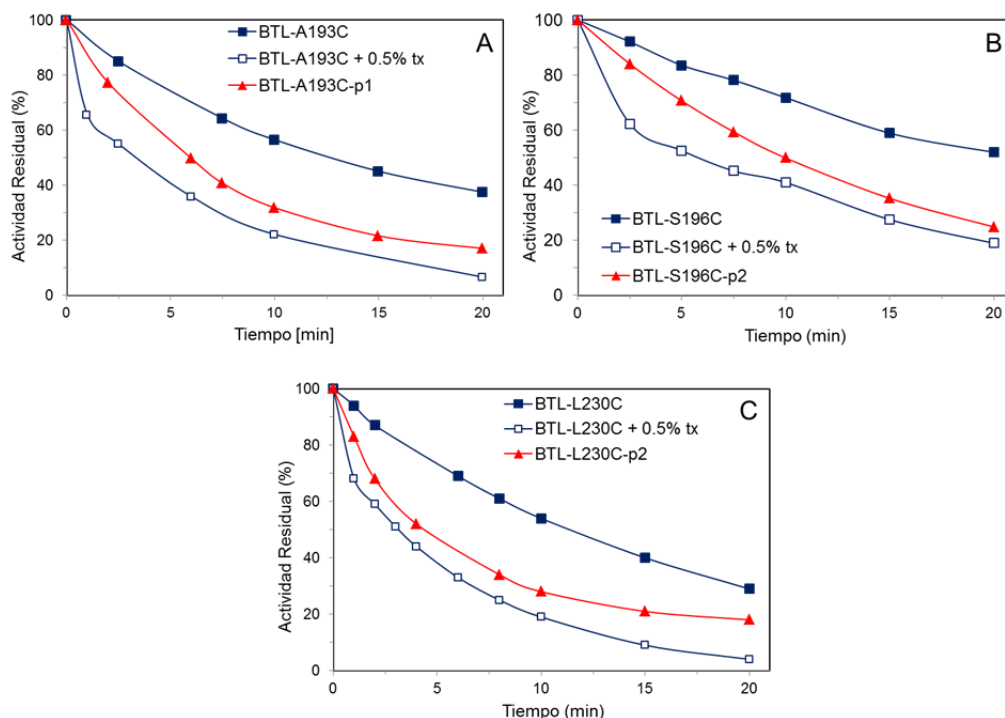


Figura 3.11. Inhibición irreversible con D-pNP de BTL y sus conjugados: A) BTL*-A193C; B) BTL*-S196C y C) BTL*-L230C

Al observar claros cambios estructurales después de la conjugación con los péptidos, se decide profundizar en las características cinéticas de los derivados. Se determinaron los parámetros cinéticos de los distintos mutantes y sus diferentes conjugados.

En la Tabla 3.6, se observan los parámetros cinéticos de los mutantes y conjugados de BTL. Tal como se presumía, no se observan diferencias entre BTL-WT y BTL*. También podemos ver que se observan pequeñas diferencias, tanto en K_m como en K_{cat} cuando se inserta genéticamente una cisteína en el lid. Todo lo anterior, se correlaciona con los resultados estructurales y las aplicaciones de estos mutantes en la sección anterior.

Al analizar la influencia de la incorporación de péptido sobre los parámetros cinéticos, se puede apreciar un drástico incremento en la K_m , de más de 6 veces en el caso de BTL*-A193C-p1 y BTL*-S196C-p2. También es posible apreciar cambios en el K_{cat} , pero los cambios dependen de la posición y el péptido insertado, de forma similar con lo ocurrido con los espectros de fluorescencia.

Tabla 3.6. Parámetros cinéticos de los conjugados de BTL en la hidrólisis de pNPB a pH 7.0 y 25°C

Enzima	Péptido	K_m (mM)	V_m ($\mu\text{mol/min}$)	K_{cat} (s^{-1})	K_{cat}/K_m ($\text{M/s} \cdot 10^{-5}$)
BTL-WT	-	1.23	18.7	2.7	6.23
BTL*	-	1.20	19.3	2.8	6.57
BTL*-A193C	-	0.88	18.3	2.6	8.47
BTL*-A193C	p1	5.75	11.8	1.7	0.84
BTL*-S196C	-	0.91	22.0	3.2	9.85
BTL*-S196C	p2	5.81	34.6	5.0	2.44
BTL*-L230C	-	0.76	16.2	2.3	8.74
BTL*-L230C	p2	2.85	10.4	1.5	1.50

d. Simulaciones de dinámica molecular

Con la finalidad de dilucidar los cambios causados por la incorporación de los péptidos, se llevó a cabo distintas simulaciones de dinámica molecular. Todo este trabajo se realizó en cooperación con el Grupo de Cristalografía y Biología Estructural, dirigido por el Prof. Juan Hermoso.

Se seleccionaron 2 conjugados para la dinámica molecular: BTL*-A193C-p1 y BTL*-S196C-p2. Como primer paso, se construyó un modelo de transición entre la estructura cerrada y abierta, basándose en la estructura en las estructuras depositadas en PDB. Con este modelo, y analizando la exposición al solvente e evitando los posibles impedimentos estéricos, se seleccionaron los puntos críticos donde se podría incorporar cada péptido.

El modelo resultante para BTL*-A193C-p1 se muestra en la Figura 3.12. Las simulaciones muestran que el conjugado BTL*-A193C-p1 muestra un sitio catalítico más pequeño con un área de 679.8Å (calculado mediante CASTp), en comparación con BTL-WT que posee un área de 849.4Å (Carrasco-Lopez et al. 2009). Se puede observar, que una de las cavidades (binding poquet) se reduce notoriamente. Esta es la cavidad donde se teóricamente se aloja una de las cadenas de tritón en la estructura abierta (Figuras 3.12A y 3.12B), correspondiente al acil poquet de la lipasa. En las figura 3.12C y 3.12D, podemos observar que el péptido se localiza cerca de la entrada del sitio activo, y que este interacciona de manera hidrofóbica con los aminoácidos Phe28 y L26.

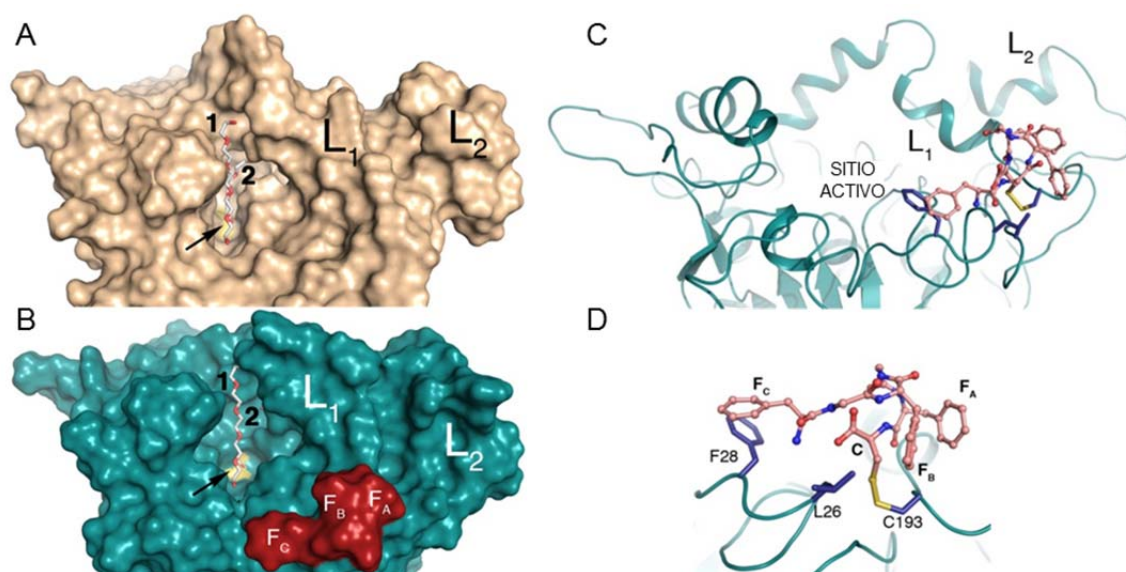


Figura 3.12. Resultados de la dinámica molecular de BTL*-A193C-p1. Comparación entre la estructura cristalizada de BTL (A) y la estructura modelada del conjugado BTL*-A193C-p1 (B). L1 y L2 corresponde a los lids de la lipasa. Las moléculas de Tritón X-100 complejas en el sitio activo se muestran (1 y 2). La posición del péptido se demarca en rojo, señalando los residuos aromáticos (FA, FB y FC). Representación del sitio activo de BTL*-S196C-p2 (C) e interacciones del péptido con los aminoácidos de la proteína (D)

Por su parte el conjugado BTL*-S196C-p2 también muestra una cavidad catalítica más pequeña, con un área de 668.9 Å (calculado mediante CASTp). En la Figura 3.13, se observa que el péptido p2 se localiza entre los dos lids de la lipasa, estabilizado por una red por fuertes interacciones, mayoritariamente puentes salinos con residuos básicos presentes en ambos lids (Lys190 y Lys230). Una vista detallada de las interacciones del péptido con los aminoácidos de la proteína se muestra en la Figura 3.13D.

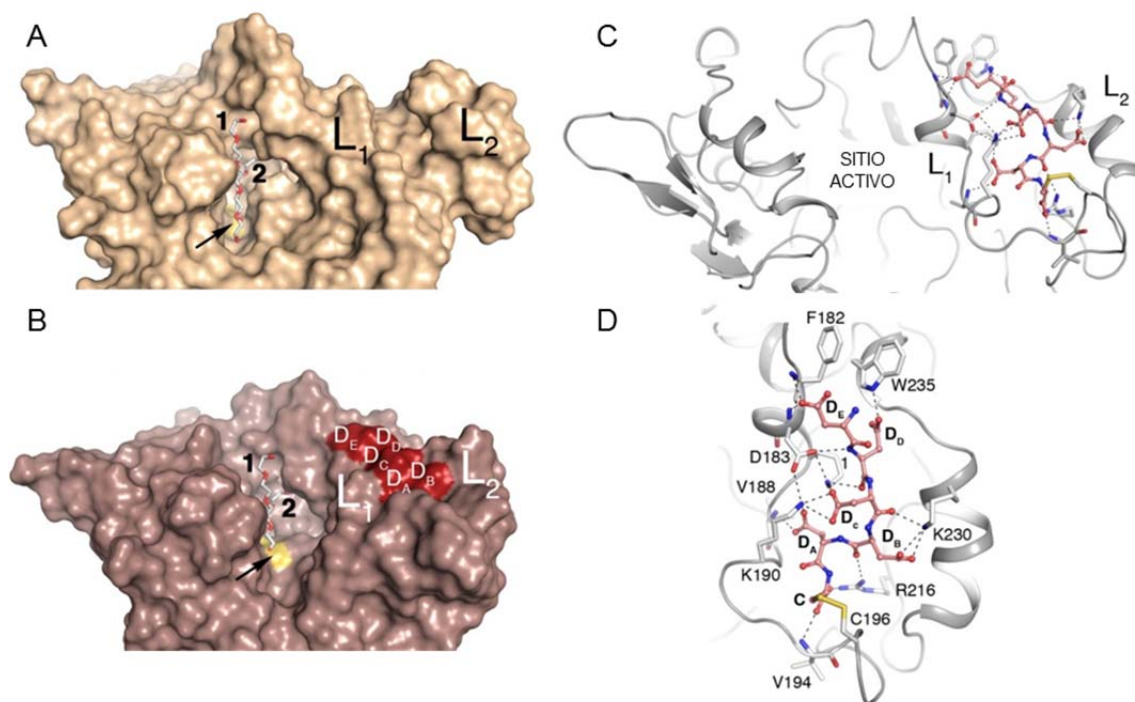


Figura 3.13. Resultados de la dinámica molecular de BTL*-S196C-p2. Comparación entre la estructura cristalizada de BTL (A) y la estructura modelada del conjugado BTL*-S196C-p2 (B). L1 y L2 corresponde a los lids de la lipasa. Las moléculas de Tritón X-100 complejas en el sitio activo se muestran (1 y 2). La posición del péptido se demarca en rojo, señalando los residuos del ácido aspártico (DA, DB, DC, DD y DE). Representación del sitio activo de BTL*-A193C-p1 (C) e interacciones del péptido con los aminoácidos de la proteína (D).

e. Extensión del método y construcción de una biblioteca de biocatalizadores.

El método de modificación fue extendido a otros 6 péptidos, con diferencia en la secuencia y posición de la cisteína (marcada en negrita en la Tabla 3.7), para obtener diferentes conjugados. Todos los conjugados fueron obtenidos en rendimientos cuantitativos.

Los 3 mutantes de BTL (BTL*-A193C, BTL*-S196C y BTL*-L230C) combinados con los distintos péptidos hechos a medida, genera una biblioteca de biocatalizadores con posibles e interesantes cambios estructurales.

Tabla 3.7. Secuencia de los diferentes péptidos utilizados

Secuencia del péptido incorporado	Nomenclatura
Ac-Cys-Phe-Gly-Phe-Gly-Phe-CONH ₂	p1
Ac-Cys-(Asp) ₄ -Asp-COOH	p2
Ac-Phe-Cys-Phe-Gly-Phe-CONH ₂	p3
Ac-Gly-Gly-Cys-Gly-Gly-CONH ₂	p4
Ac-Cys-(Arg) ₇ -CONH ₂	p5
Ac-Cys-(Phe-Gly) ₂ -Asp-Asp-CONH ₂	p6
Ac-Asp-Gly-Asp-Cys-Asp-CONH ₂	p7
Ac-Lys-Gly-Lys-Cys-Lys-CONH ₂	p8

Para confirmar esto último, se analizó el espectro de fluorescencia de los distintos variantes de BTL inmovilizados. Como se observa en la Figura 3.14, después de la incorporación de los diferentes péptidos se producen claros cambios tanto el perfil del espectro como en la intensidad.

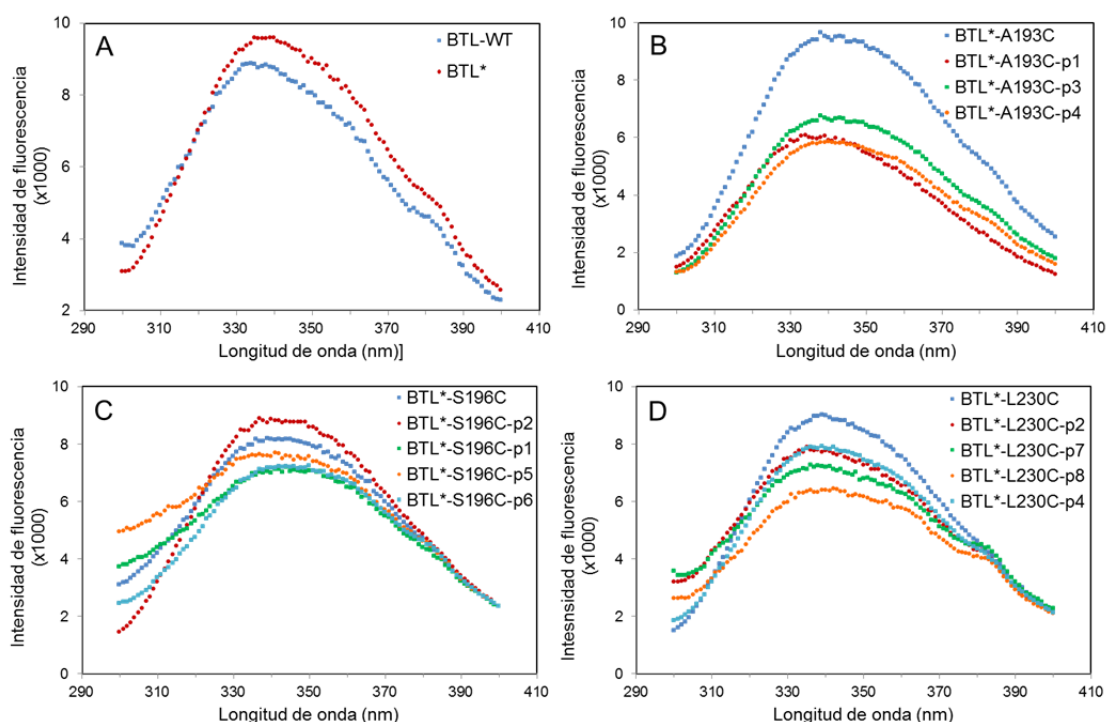


Figura 3.14. Espectros de fluorescencia de la biblioteca catalizadores de BTL: BTL y BTL* (A); BTL*-A193C y sus conjugados (B); BTL*-S196C y sus conjugados (C); BTL*-L230C y sus conjugados (D)

f. Aplicación de las lipasas semisintéticas en biotransformaciones

Con la finalidad de investigar el efecto sobre las propiedades catalíticas de la incorporación de péptidos en los variantes BTL, los nuevos biocatalizadores se utilizaron en tres biotransformaciones diferentes. Se estudiaron 2 reacciones de deprotección regioselectiva: timidina per-*O*-acetilada (8) y glucal peracetilado (9). Además se estudió la desimetrización del diéster del ácido dimetilfenilglutarico (4).

En la hidrólisis regioselectiva de 14 (Tabla 3.8 y Tabla 3.9), las variantes BTL*-A193C y BTL*-L230C hidrolizan preferentemente en la posición C-5 de la ribosa con una ligera mejora en la regioselectividad que BTL-WT y BTL*. La incorporación de p1 en BTL*-A193C y de p2 en BTL*-L230C, mejora la regioselectividad de la enzima. Además el conjugado BTL*-A193C-p1 muestra incremento en la actividad de 1.3 y 2.3 veces a pH 7.0 y 5.0, respectivamente. Sin embargo la modificación con otros péptidos (p3 y p4 en el caso de BTL*-A193C y p4, p7 y p8 en el caso de BTL*-L230C) no producen mejores resultados tanto en términos de actividad y regioselectividad.

Tabla 3.8. Hidrolisis regioselectiva de timidina per-acetilada con los diferentes conjugados lipasa-péptidos a pH 7.0

Enzima	péptido	Actividad ^a	Tiempo [h]	Rendimiento ^b		
				8a [%]	8b [%]	8c [%]
BTL-WT	-	110	80	59	8	33
BTL*	-	130	70	52	5	44
BTL*-A193C	-	128	93	79	8	13
BTL*-A193C	p1	172	48	88	4	7
BTL*-A193C	p3	112	48	44	41	14
BTL*-A193C	p4	116	96	48	49	33
BTL*-S196C	-	30	30	3	42	55
BTL*-S196C	p1	8	44	2	28	70
BTL*-S196C	p2	24	30	3	41	56
BTL*-S196C	p5	8	44	14	11	75
BTL*-S196C	p6	30	48	36	55	9
BTL*-L230C	-	154	57	61	14	25
BTL*-L230C	p2	86	93	86	4	10
BTL*-L230C	p4	186	96	62	2	35
BTL*-L230C	p7	2	144	35	37	28
BTL*-L230C	p8	4	72	50	30	20

^a Actividad específica definida como $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g} \times 10^{-5}$ ^b Rendimiento del producto a 100% de conversión

Sorprendentemente, la introducción de la cisteína en la posición 196 (entre ambos lids) causa la inversión en la regioselectividad. BTL*-S196C hidroliza 8 en la posición C-3 con una muy buena regioselectividad a pH 5.0 (86% de 8b). La incorporación de p2 a este mutante, incrementa la regioselectividad hasta un excelente rendimiento de 97% de 8b, sin trazas de 8a. Este es el mejor resultado reportado en literatura hasta ahora para la resolución de nucleósidos. La incorporación de otros péptidos a este mutante, como p1 y p5, también mejora la regioselectividad pero a valores ligeramente menores que BTL*-S196C-p2.

En general, los conjugados de BTL*-A193C y BTL*-L230C muestran una baja especificidad cuando la reacción se realiza a pH 5.0, en cambio ocurre lo contrario con BTL*-S196C.

Tabla 3.9. Hidrolisis regioselectiva de timidina per-acetilada con los diferentes conjugados lipasa-péptidos a pH 5.0

Enzima	péptido	Actividad ^a	Tiempo [h]	Rendimiento ^b		
				8a [%]	8b [%]	8c [%]
BTL-WT	-	74	96	65	6	29
BTL*	-	86	80	70	4	26
BTL*-A193C	-	154	72	91	3	6
BTL*-A193C	p1	354	48	89	4	7
BTL*-A193C	p3	88	96	65	1	33
BTL*-A193C	p4	80	96	68	1	31
BTL*-S196C	-	20	50	0	86	13
BTL*-S196C	p1	8	30	1	95	4
BTL*-S196C	p2	2	100	0	97	3
BTL*-S196C	p5	2	100	0	96	4
BTL*-S196C	p6	28	48	2	82	16
BTL*-L230C	-	110	69	66	8	26
BTL*-L230C	p2	44	162	85	8	6
BTL*-L230C	p4	70	162	45	6	27
BTL*-L230C	p7	6	192	61	6	34
BTL*-L230C	p8	8	96	62	2	35

^a Actividad específica definida como $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g} \times 10^{-5}$ ^b Rendimiento del producto a 100% de conversión

A continuación se estudió una segunda reacción de deprotección regioselectiva, la hidrolisis de glucal per-O-acetilado (9). Las distintas enzimas semisintéticas fueron regioselectivas hacia la monoprotección de C-3, generando (9a) como producto principal. Cuando se introduce una cisteína en la posición 193, se observó un sorprendente aumento de más de 36 veces en la actividad. La incorporación de p1 produce un ligero incremento en la actividad pero no en la regioselectividad, en cambio cuando p3 es introducido en BTL*-A103C se produce una mejora en el rendimiento de 9a, desde un 70% a un excelente 94%. En el caso de los otros dos mutantes, no se produjeron mejoras después de la incorporación de los péptidos.

Tabla 3.10. Hidrolisis regioselectiva de glucal peracetilado con los diferentes conjugados lipasa-péptidos a pH 7.0

9 9a

Enzima	Péptido	Actividad ^a	Tiempo [h]	9a ^b [%]
BTL-WT	-	5	24	72
BTL*	-	5	24	79
BTL*-A193C	-	183	1	70
BTL*-A193C	p1	214	1	73
BTL*-A193C	p3	40	5	94
BTL*-A193C	p4	79	5	92
BTL*-S196C	-	68	2.5	94
BTL*-S196C	p1	29	24	72
BTL*-S196C	p2	2	40	57
BTL*-S196C	p5	7	24	77
BTL*-S196C	p6	4	24	86
BTL*-S230C	-	98	3	72
BTL*-S230C	p2	63	3	50
BTL*-S230C	p4	64	5	66
BTL*-S230C	p7	6	24	61
BTL*-S230C	p8	6	24	67

^a Actividad específica definida como $\mu\text{mol min}^{-1} \text{g} \times 10^{-3}$ ^b Rendimiento de 19 a 100% de conversión

Finalmente, se seleccionaron algunos de los conjugados para ser estudiados en la hidrolisis asimétrica de (4). Los resultados se muestran en la Tabla 3.11, donde se observa que los 3 mutantes con una cisteína en el lid muestran una importante mejora en la enantioselectividad en comparación a BTL-WT y BTL*, alcanzado un muy buen e.e de 93% con BTL*-L230C. Además, las variantes de BTL*-S196C y BTL*-L230C muestran un aumento en la actividad específica de alrededor de un 50%.

Sin embargo los mejores resultados se observan con algunos de los conjugados. Podemos apreciar que 3 de conjugados lipasa-péptidos, BTL*-A193C-p1, BTL*-S196C-p1 y BTL*-S196C-p2, son capaces de catalizar la reacción de forma completamente enantioselectiva generando solo (S)-4a. De estos 3 destacan las los conjugados de BTL*-S196C con p1 y p2, ya que ambos muestran una excelente actividad específica.

Tabla 3.11. Hidrólisis enantioselectiva de dimetilfenilglutarico con los diferentes conjugados lipasa-péptido a pH 7.0

Enzima	Péptido	Actividad ^a	Tiempo [h]	Conv. ^b [%]	Rendimiento ^c [%]	e.e. ^d [%]
BTL-WT	-	8.48	196	48	42	68
BTL*	-	7.61	196	28	23	64
BTL*-A193C	-	0.53	186	23	15	78
BTL*-A193C	p1	2.35	96	54	37	>99
BTL*-S196C	-	12.1	50	95	14	94
BTL*-S196C	p1	11.8	50	68	34	>99
BTL*-S196C	p2	13.3	50	87	21	>99
BTL*-S196C	p5	13.4	50	90	25	95
BTL*-L230C	-	11.33	96	65	38	93
BTL*-L230C	p2	1.13	96	26	12	73

^a Actividad específica definida como $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}_{\text{prot}} \times 10^{-5}$ ^b Conversión de 4 (%)^c Rendimiento de 4a a la conversión indicada^d Determinado entre 10-15% de conversión mediante HPLC Quiral

Se ha descrito un método para la creación de lipasas semisintéticas a partir de la incorporación sitio-específica de péptidos hechos a medida. A partir de esta metodología, se creó una biblioteca de nuevos biocatalizadores con importantes cambios estructurales, que se tradujeron en algunos casos en importantes mejoras en las propiedades catalíticas.

Finalmente, se ha desarrollado una estrategia simple, altamente eficiente, quimioselectiva y potencialmente general para la síntesis de conjugados de proteínas con polímeros y/o péptidos en fase sólida. Los nuevos conjugados fueron caracterizados estructuralmente y sus propiedades catalíticas, reportando importantes mejoras en regioselectividad, enantioselectividad y actividad. Estos resultados sientan los cimientos para la creación de enzimas semisintéticas en fase sólida con mejores actividades o incluso para la incorporación de actividades no naturales.

5. Conclusiones

Utilizando un enfoque multidisciplinar, mediante el uso de herramientas bioinformáticas, biología molecular, química de proteínas y síntesis en fase sólida, se desarrolló exitosamente una estrategia altamente eficiente y sitio-selectiva para la modificación en fase sólida de lipasas con polímeros o péptidos.

- a. Mediante ligación de intercambio de disulfuro, se realizó de forma exitosa la incorporación sitio-dirigida de polímeros y péptidos hechos a medida en el lid de diferentes mutantes de BTL.
- b. La modificación sitio-específica del lid de la lipasa permitió la modificar y modular las propiedades catalítica de la lipasa.
- c. A través de la conjugación de diferentes polímeros (con diferente tamaño y carga iónica) con distintos mutantes de BTL, se construyó una pequeña biblioteca de biocatalizadores con distintas y mejoradas propiedades.
- d. Los conjugados de lipasa con polímeros iónicos fueron exitosamente aplicados a interesantes reacciones biotecnológicas mostrando excelentes resultados. En la hidrólisis de timidina peracetilada se destaca el catalizador BTL*-A193C-Dext-COOH 1500, que muestra un aumento de 3 veces en la actividad y una mejora en la regioselectividad, alcanzando un rendimiento de 92% de 3'-O-acetil-timidina (XX). Por otra parte en la hidrólisis asimétrica de dimetil fenilglutarico, los mejores resultados se obtuvieron con BTL*-A193C-Dext-NH₂ 6000, que muestra un incremento de más d 5 veces en su actividad y un excelente e.e de >99%.
- e. Se desarrolló una estrategia de conjugación elegante y a su vez muy específica, mediante la incorporación de péptidos complementarios a los aminoácidos presente en el lid de la lipasa, de forma de promover cambios conformacionales específicos.
- f. Los nuevos catalizadores, lipasas-péptidos, fueron exitosamente caracterizados tanto estructuralmente como catalíticamente, mostrando importantes cambios estructurales después de la conjugación con los péptidos. Los nuevos conjugados lipasa-péptido muestran un desplazamiento del equilibrio conformacional hacia la forma abierta, lo que se traduce en diferentes parámetros cinéticos.
- g. Utilizando herramientas bioinformáticas, simulación de dinámica molecular, se identificaron las posibles interacciones entre el péptido y la lipasa, y los cambios estructurales después de la conjugación. Se demostró que los cambios estructurales dependen del péptido y de la posición donde este se incorpora.

- h. Los nuevos conjugados lipasa-péptidos semisintéticos fueron exitosamente aplicados en 3 biotransformaciones, mostrando importantes mejoras en la actividad, regio y enantioselectividad. La combinación de mutagénesis dirigida y la incorporación selectica de un péptido permite la inversión e incremento de la regioselectividad en la hidrolisis de timidina per-acetilada, cuando es catalizada por BTL*-S196C-p2. De forma similar, el catalizador BTL*-A193C-p3 mostró un aumento de más de 5 veces en la actividad y un incremento en la regioselectividad (94%) en la hidrolisis de glucal per-acetilado.
- i. También los catalizadores se mostraron altamente enantioselectivos, BTL*-A193C-p1, BTL*-S196C conjugado con p1 o p2, catalizando la hidrolisis asimétrica de dimetil fenilglutarico con un exceso enantiomérico >99%.

Capítulo 4:

Rediseño del sitio activo de BTL: incorporación dirigida de grupos funcionales no naturales mediante modificación química

1. Introducción

Los procesos catalizados por enzimas pueden mostrar excelentes enantio y regio selectividad, siendo esta la mayor motivación del uso de biocatalizadores en síntesis asimétrica (Faber 2011; Palomo y Cabrera 2012). Sin embargo, puede ser que la enzima con la adecuada selectividad para la aplicación que se desea no exista, por lo que se hace necesario desarrollar estrategias para mejorar la selectividad en las enzimas.

Diferentes metodologías han sido aplicadas para la mejora de la selectividad de diversas enzimas, y siendo las lipasas una de las enzimas más utilizadas estas no son la excepción. La mejora y modulación en la selectividad de lipasas ha sido llevada a cabo utilizando diversas estrategias, tales como: screening, inmovilización controlada (Palomo 2008, 2009), ingeniería de enzimas (Bornscheuer y Pohl 2001), evolución dirigida (Reetz 2002), entre otras.

Actualmente, una de las estrategias más difundida y aplicada para la mejora de la selectividad de lipasas es la evolución dirigida (Turner 2009; Otten et al. 2010). Generalmente, el éxito de estrategia se logra a través de un exhaustivo y trabajoso screening de un gran número de mutantes y de múltiples mutaciones en toda la estructura de la proteína. Recientemente, el uso de metodologías como CASTing (saturación combinatorial del sitio activo), permiten enfocarse específicamente en el sitio activo, reduciendo considerablemente el número de mutantes a estudiar (Reetz et al. 2006). Otra estrategia usualmente muy utilizada es el rediseño del sitio activo de manera racional o semiracional, basándose en el conocimiento de estructura de la proteína y del mecanismo de reacción que se quiere mejorar (Toscano et al. 2007).

En la actualidad la habilidad de alterar la estructura de las proteínas mediante mutaciones al nivel del ADN, previo a la traducción, son técnicas robustas y rutinarias que permiten la conversión de los 20 aminoácidos naturales (Toscano et al. 2007). Sin embargo, estrategias de modificación química postransduccionales abren el abanico a amino ácidos no naturales o distintos grupos funcionales que mediante técnicas de mutagénesis dirigida o sistemas de expresión convencionales no es posible alcanzar (Davis 2004; Sletten y Bertozzi 2009). Es así que durante los últimos años, la combinación de mutagénesis de sitio dirigida y modificación química ha emergido como una poderosa herramienta para el estudiar la estructura, función y dinámica de proteínas, mediante la incorporación dirigida de diversas sondas, como ejemplo fluoróforos (Carrico 2008; Hermanson 2008). Asimismo esta estrategia puede, y ha sido aplicada a la mejora de biocatalizadores (Díaz-Rodríguez y Davis 2011). Diversas estrategias de modificación química dirigida de proteínas han sido utilizadas para mejorar la actividad (Godoy et al. 2010; Godoy et al. 2011a), estabilidad y selectividad de diversas enzimas (Palomo et al. 2007; Romero et al. 2012).

Dentro de la gran variedad de metodologías disponibles para modificar selectivamente proteínas, la modificación de cisteínas con reactivos activados con metanotiosulfonatos (MTS) se muestra como una

de las más utilizadas y ventajosas (DeSantis y Jones 1999; Hermanson 2008). Los MTS reaccionan específicamente y de forma cuantitativa con los sulfhídricos de las cisteínas en condiciones suaves de pH y temperatura, sin una necesidad de un gran exceso de reactivos. Adicionalmente, es posible encontrar de forma comercial una gran variedad de compuestos funcionalizados con MTS (DeSantis y Jones 1999). El mecanismo de la reacción se muestra en la Figura 4.1.

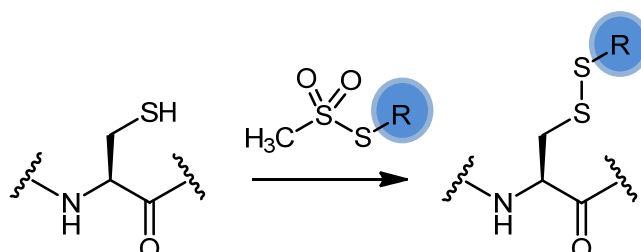


Figura 4.1 Mecanismo de reacción de compuestos metanotiosulfonatos con cisteínas.

Como se ha mencionado previamente, existen diversos ejemplos de modificación química de proteínas pero son escasos los casos enfocados en la modificación y alteración del sitio activo (Berglund et al. 1996; DeSantis y Jones 1999). En el caso específico de las lipasas, el sitio activo está constituido por una triada catalítica Ser-His-Asp, un “oxianion hole” y por un “bindind pocket” compuesto por 2 dominios, uno para la parte del acilo y otro para la parte del alcohol. Específicamente analizando específicamente el sitio activo de BTL, podemos observar una cavidad catalítica bastante grande en comparación con otras lipasas, con unas dimensiones de 18x25 Å y un volumen de 1183 Å³ (Carrasco-Lopez et al. 2009). En la base de la cavidad se encuentra la cadena lateral de Phe17, que divide el sitio activo en dos partes otorgando una forma de boomerang, muy característico de muchas lipasas.

Basándose en las características de la lipasa BTL, a continuación se mostrará el estudio del rediseño del sitio activo mediante la combinación de mutagénesis dirigida y modificación química sitio específica. Mediante esta estrategia se introducirán distintos grupos funcionales no naturales y estudiar su influencia sobre las propiedades catalíticas, enfocándose en la modulación de la enantioselectividad frente a distintos esteres racémicos.

2. Objetivo

A través de la combinación de mutagénesis de sitio dirigida y modificación química se plantea el rediseño del sitio activo de la lipasa BTL mediante la incorporación de grupos funcionales no naturales, con la finalidad de mejorar las propiedades catalíticas de la enzima.

Objetivos específicos

- a. A partir de un estudio bioinformático basado en las estructuras cristalizadas de las conformaciones abierta y cerrada de BTL, seleccionar y diseñar mutantes con una cisteína dentro de la cavidad catalítica.
- b. Desarrollar una estrategia de modificación en fase sólida, para la introducción de grupos funcionales no naturales, mediante el uso de reactivos activados con metanotiosulfonatos.
- c. Crear una biblioteca de biocatalizador mediante la combinación de diferentes mutantes y su modificación con distintos grupos funcionales no naturales.
- d. Caracterizar las propiedades catalíticas de las nuevas lipasas modificadas.
- e. Estudiar el efecto de la incorporación de funcionalidades no naturales en el entorno catalítico de la lipasa BTL sobre su enantioselectividad frente a distintos esteres quirales.

A partir de los resultados obtenidos se adicionó un objetivo específico adicional:

- f. Estudiar el efecto de reemplazar la Phe17 por aminoácidos menos voluminosos sobre la enantioselectividad de la lipasa.

3. Materiales y Métodos

3.1. Reactivos

Octil-agarosa 6BCL y BrCN-agarosa 4BCL es proporcionado por GE Healthcare (Suecia). Ditiotreitól (DTT), p-nitrofenol (pNPB) (1), etil-2-hidroxi-4-fenilbutirato (6) fueron suministrados por Sigma. Ácido (±)-2-O-butil-2-fenilacético (7) fue sintetizado como previamente ha sido descrito (Palomo et al. 2003b). Los distintos reactivos activados con MTS, Alilo-metanotiosulfonato (MTS-A), 3-butino-metanotiosulfonato (MTS-B), 2-quinuclidine etil metanotiosulfonato (MTS-Q) fueron proporcionados por Toronto Chemical Research (Canada). Otros reactivos y solventes fueron de grado analítico.

3.2. Mutagénesis dirigida de BTL

Todos los experimentos de mutagénesis dirigida se realizaron de forma similar a la descrita en la sección 3.2 del Capítulo 2 (pág. 43). Los primers utilizados en este capítulo se muestran a continuación en la Tabla 4.1

Tabla 4.1. Primers utilizados para la mutagénesis dirigida de BTL

Mutante	Plásmido templado	Primers
C65S/C296S/F17C (BTL*-F17C)	pT1BTL2mutCys ⁽²⁾	Phe/Cys 17-5' 5'- GCTTCTCCATGGGtgTACAGGATGGGGGC Phe/Cys 17-3' 5'- GCCCCCATCCTGTacaCCCATGGAGAAGC
C65S/C296S/L245C (BTL*-L245C)	pT1BTL2mutCys ⁽²⁾	Leu/Cys 245-5' 5'- GATACTGCCCCGCTACGATtgcTCCATTCCCGGAGC ' Leu/Cys 245-3' 5'- GCTCCGGGAATGGAgaATCGTAGCGGGCAGTATC
C65S/C296 (BTL*-296C)	pT1BTL2	Cys/Ser 65-5' 5'- CAACTGGGACCGGGCGagcGAAGCGTACGCCAG Leu/Cys 65-3' 5'- CTGGGCGTACGCTTCgctCGCCCCGGTCCCAGTTG'
C65S/C296S/I320C (BTL*-I320C)	pT1BTL2mutCys ⁽²⁾	Ile/Cys320-5' 5'- GCTGGAGAACGATGGCtgcGTCAACACGGTTTCG ' Ile/Cys320-3' 5'- CGAAACCGTGTGACGCagcCATCGTTCTCCAGC

¹ El cambio en el nucleótido para introducir la mutación se indica en minúscula

² Plásmido con mutante de BTL sin las 2 Cys nativas (Cys65 y Cys 296)

Mutagénesis de saturación de la posición F17 de BTL

Adicionalmente, se realizó una pequeña biblioteca de mutantes en la posición Phe17, de forma similar a la descrita en la sección 3.2 del Capítulo 2 (pág. 43). Los primers utilizados para la construcción de estos mutantes se muestran en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2. Primers utilizados para la mutagénesis dirigida de BTL en la posición 17.

Mutante	Plásmido templado	Primers
C65S/C296S/F17A (BTL*-F17A)	pT1BTL2mutCys ⁽²⁾	Phe/Ala 17-5 5'- GTGCTTCTCCATGGGgctACAGGATGGGGGCG Phe/Ala 17-3 5'- CGCCCCATCCTGTAgccCCATGGAGAAGCAC
C65S/C296S/F17S (BTL*-F17S)	pT1BTL2mutCys ⁽²⁾	Phe/Ser 17-5 5'- GTGCTTCTCCATGGGgagACAGGATGGGGGCG Phe/Ser 17-3 5'- CGCCCCATCCTGTActCCATGGAGAAGCAC
C65S/C296S/F17G (BTL*-F17G)	pT1BTL2mutCys ⁽²⁾	Phe/Gly 17-5 5'- GTGCTTCTCCATGGGggtACAGGATGGGGGCG Phe/Gly 17-3 5'- CGCCCCATCCTGTAcccCCATGGAGAAGCAC
C65S/C296S/F17D (BTL*-F17D)	pT1BTL2mutCys ⁽²⁾	Phe/Asp 17-5 5'- GTGCTTCTCCATGGggaTACAGGATGGGGGCG Phe/Asp 17-3 5'- CGCCCCATCCTGTATcccCATGGAGAAGCAC

¹ El cambio en el nucleótido para introducir la mutación se indica en minúscula

² Plásmido con mutante de BTL sin las 2 Cys nativas (Cys65 y Cys 296)

3.3. Clonaje, expresión y purificación.

Los experimentos de clonaje, expresión y purificación se realizaron como esta descrito en la sección 3.3 del Capítulo 2 (pág.43).

3.4. Inmovilización en agarosa activada con Bromuro de cianógeno (BrCN).

La inmovilización en BrCN se realizó como esta descrito en la sección 3.4 del Capítulo 2 (pág.44).

3.5. Ensayo de actividad Enzimática (pNPB).

La actividad enzimática de cuantifico como esta descrito en la sección 3.7 del Capítulo 1 (pág. 25).

3.6. Cuantificación de grupos tioles de los catalizadores inmovilizados

La cuantificación de los tioles se realizó como esta descrito en la sección 3.8 del Capítulo 2 (pág. 45).

3.7. Modificación química dirigida de BTL utilizando metanotiosulfonatos derivados.

Con la finalidad de reducir la cisteína genéticamente introducida, 0.2 g de los diferentes mutantes de BTL previamente inmovilizados fueron incubados en 2 mL en una solución de 50 mM DTT con 0.2% (v/v) de Triton-X100 en tampón fosfato 25 mM pH 7.0 a 25°C durante 30 minutos. Posteriormente, los catalizadores fueron filtrados y lavados con agua destilada hasta desaparecer el DTT por completo.

A continuación, los derivados reducidos fueron modificados con los distintos compuestos derivados de metanotiosulfonatos (MTS-A, MTS-B, MTS-Q). Para esto, los MTS fueron disueltos en 2 mL de una mezcla 50% DMSO / 50% tampón fosfato 25 mM pH 8.0 con 0.2% (v/v) de Triton-X100 en una concentración final de 1.5 mM. Posteriormente, a esta solución se agregó los 0.2 g de los derivados previamente reducidos, ajustando nuevamente el pH a 8.0 e incubándolos en agitación durante 16 h. Posteriormente, los catalizadores fueron filtrados y lavados con abundante agua destilada.

El rendimiento de la modificación se cuantificó mediante la diferencia de tioles antes y después la modificación utilizando el método de Ellman previamente descrito.

3.8. *Determinación de los parámetros cinéticos de mutantes en la posición Phe17.*

La determinación de las constantes cinéticas (k_{cat} y K_m) de los diferentes mutantes inmovilizados de BTL se llevó a cabo de forma similar a la descrita en la sección 3.17 del Capítulo 3 (pág. 70).

3.9. *Hidrolisis enzimática de Acido (\pm)-2-hidroxi-4-fenilbutirato de etilo (HPBet) (6)*

La hidrolisis y la cuantificación de (6) se realizaron como esta descrito en la sección 3.13 del Capítulo 2 (pág. 46).

3.10. *Hidrolisis de enantioselectiva de Acido (\pm)-2-O-butiril-2-fenilacético (7)*

La hidrolisis y la cuantificación de (7) se realizaron como esta descrito en la sección 3.14 del Capítulo 2 (pág. 47).

4. Resultados

4.1. Estudio bioinformático y diseño de las mutaciones en el sitio activo de BTL

Con el objetivo de mejorar la actividad y selectividad de BTL, se estudió el rediseño del sitio activo de la lipasa mediante la combinación de mutagénesis-dirigida con modificación química. Basándonos en la estructura cristalizada de BTL (Carrasco-Lopez et al. 2009), se diseñaron distintos mutantes con una cisteína dentro la cavidad catalítica. De forma similar que el capítulo anterior, las cisteínas fueron incorporadas en un mutante de BTL sin las 2 cisteínas nativas (BTL-C65S/C296S, BTL-*). Los aminoácidos seleccionados para la modificación fueron: Phe17, Leu245, Cys296 y Ile320 (Figura 4.2).

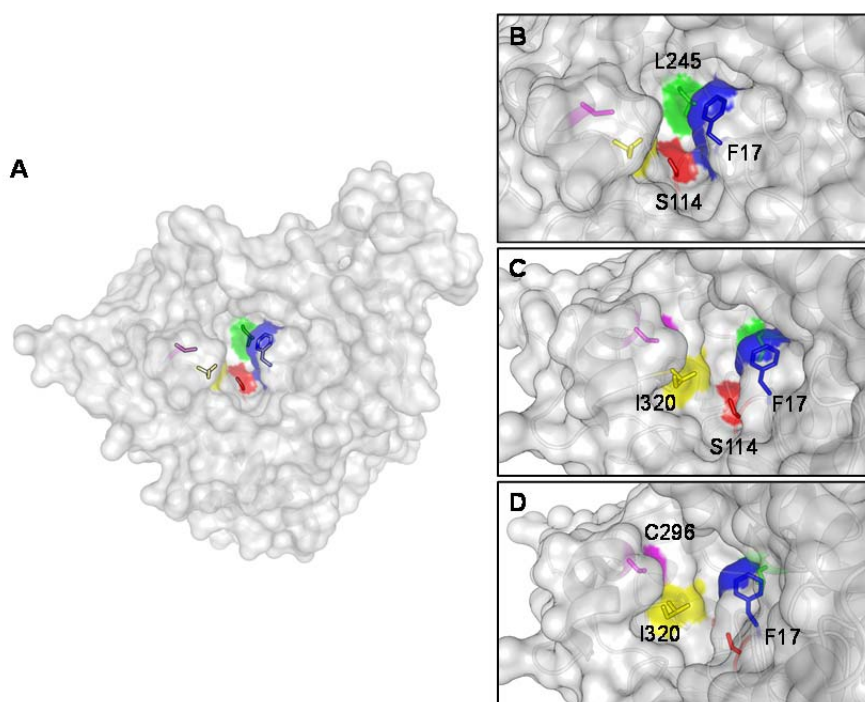


Figura 4.2 Representación de la superficie del sitio activo de la lipasa BTL. La serina catalítica se muestra en rojo. Los aminoácidos seleccionados para la mutagénesis y posterior modificación se muestran en color: F17 (azul), L245 (verde), C296 (rosado) y I320 (amarillo).

Como se muestra en la Figura 4.2, las posiciones Phe17, Leu245 e Ile320 se encuentran alrededor de la Ser114, (serina catalítica). Estos aminoácidos forman parte de las paredes de la cavidad catalítica, conformada mayoritariamente por aminoácidos hidrofóbicos/aromáticos, que permiten el anclaje y estabilización del sustrato. Además, en el caso de la Phe17 esta juega un papel importante en la geometría del sitio activo, siendo el único aminoácido de la cavidad catalítica que sufre un cambio en su orientación entre las conformaciones cerrada y abierta de la lipasa (Carrasco-Lopez et al. 2009).

En el caso de la Cys296, es una de las cisteínas nativas y se encuentra localizada en la entrada de la cavidad catalítica por lo cual el objetivo fue ver la influencia sobre el diseño del sitio activo de un aminoácido localizado más alejado de la Ser114.

A continuación, en cooperación con Dr. López-Gallego del Instituto de Catálisis (ICP), se procedió al diseño de primers, clonaje, expresión y purificación de los mutantes de BTL.

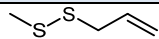
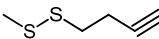
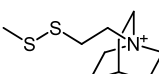
4.2. Modificación de los mutantes con MTS derivados

Los diferentes mutantes de BTL fueron expresados en *E.coli*, purificados e inmovilizado en agarosa activada con BrCN en ambos casos con una carga enzimática de 5 mg de lipasa/g de soporte, obteniéndose rendimientos mayores de 95%.

A continuación se procedió a modificar selectivamente los mutantes con 3 distintos derivados de metanotiosulfonatos: Alilo-metanotiosulfonato (MTS-A), 3-butino-metanotiosulfonato (MTS-B), 2-quinuclidine etil metanotiosulfonato (MTS-Q). Mediante la combinación de distintos mutantes y compuestos-MTS, se construyó una pequeña biblioteca de nuevas lipasas modificadas químicamente en el sitio activo (MSA).

Primero los distintos mutantes inmovilizados fueron reducidos con DTT, para después ser incubados en una solución de 1.5 mM de MTS-X (20 equivalentes) a pH 8.0 en presencia de 0.2% de tritón. Se cuantifico el rendimiento de modificación mediante el contenido de cisteínas libres (sin modificar) utilizando el método de Ellman, previamente descrito (Ellman 1959). En la Tabla 4.3 se muestran los rendimientos de modificación para cada uno de los mutantes. Se puede apreciar que en la mayoría de las variantes presenta elevados rendimientos de modificación, a excepción del mutante BTL-245C modificado con MTS-A. El bajo rendimiento de modificación puede ser debido a impedimentos estéricos en esta posición con el reactivo MTS-A.

Tabla 4.3 Rendimiento de modificación de los mutantes de BTL

MTS-X		Rendimiento ^a (%)			
		BTL*-F17C	BTL*-L245C	BTL*-296C	BTL*-I320C
MTS-A		100	60	100	87
MTS-B		100	84	98	96
MTS-Q		86	97	100	94

^a Cuantificado con reactivo de Ellmann

Una vez modificados los distintos mutantes en el sitio activo se procedió a su caracterización y evaluación de sus propiedades catalíticas.

4.3. Evaluación de las propiedades catalíticas de los mutantes de BTL modificados químicamente

Para estudiar el efecto de la mutación y posterior modificación química se evaluaron las propiedades catalíticas de los distintos catalizadores de BTL modificados en el sitio activo. Como primer punto, se evaluó su actividad específica en la hidrólisis de pNPB (1).

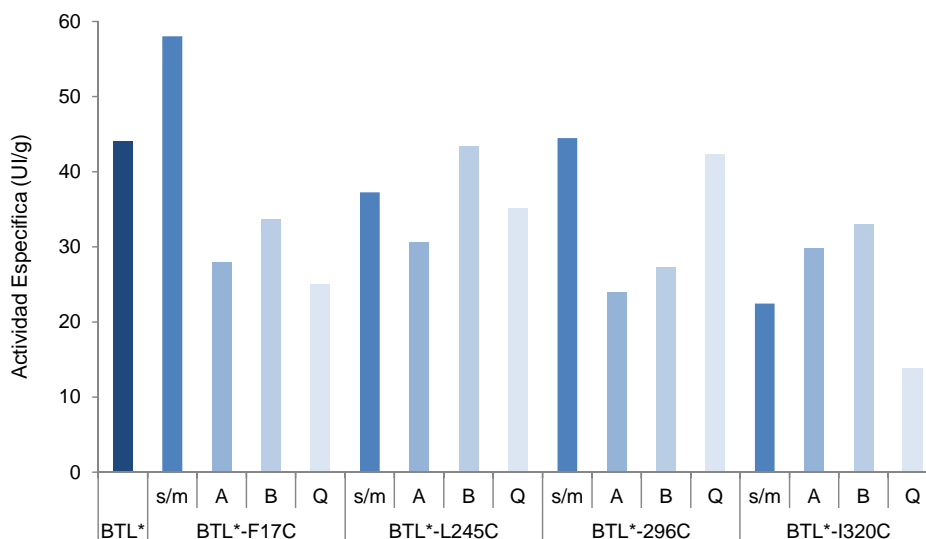


Figura 4.3 Actividad específica de MTS de BTL

La actividad específica de los distintos catalizadores modificados en el sitio activo se muestra en la Figura 4.3. Se puede observar que la modificación genética provocó cambios en la actividad específica en las distintas variantes de BTL. Existe una disminución en la actividad específica en los mutantes BTL*-L245C y BTL*-I320C con respecto a BTL*, disminuyendo a un 84% y 54%, respectivamente. Ocurre lo contrario con el mutante BTL*-17C, donde la actividad específica se ve aumentada cerca de un 30%. Como se observa en la Figura 4.2, estas 3 mutaciones se encuentran en los alrededores de la serina catalítica (Ser114), por lo que era muy probable esperar una influencia sobre la actividad. El mutante BTL-296C no presentó diferencias significativas respecto a BTL*, debido probablemente que esta mutación se encuentra bastante alejada de la Ser114.

Si analizamos el efecto de la incorporación de los distintos MTS-X sobre cada mutante, se observó que todas las variantes modificadas en la posición 17C (BTL*-F17C-X) se produjo una fuerte disminución de la actividad, alrededor de 50-60% en comparación con BTL*-F17C. Igualmente se observó una disminución significativa en la actividad para el caso del BTL*-296C.

En el caso de las modificaciones del mutante BTL*-245C, se observó un leve aumento de la actividad (15%) cuando es modificado con MTS-A. También se observó un aumento en la actividad con variantes del mutante BTL*-I320C. Las variantes BTL*-320C-A y BTL*-320C-B aumentan su actividad a un 33% y 47% respectivamente, en comparación con el mismo mutante sin modificar.

Podemos observar que tanto la mutación como la posterior modificación química tienen una gran influencia sobre la actividad de los catalizadores. El efecto sobre la actividad depende tanto de la posición como el tipo de compuesto introducido.

Otra propiedad interesante de analizar es el perfil de hiperactivación frente a detergente. A continuación en la Figura 4.4 se muestra los perfiles de hiperactivación frente a distintas concentraciones de tritón de los diferentes MSA de BTL. En el caso de BTL*-17C se observó que después de introducir un grupo funcional (A, B o C), la máxima hiperactivación se alcanza con una concentración menor de detergente. Asimismo, el valor de hiperactivación depende del compuesto introducido, observándose la mayor hiperactivación con la variante BTL*-F17C-Q (Figura 4.4.A).

Un efecto similar se observó en BTL*-296C, el cual dependiendo de la modificación realizada mostró un perfil diferente (Figura 4.4.C).

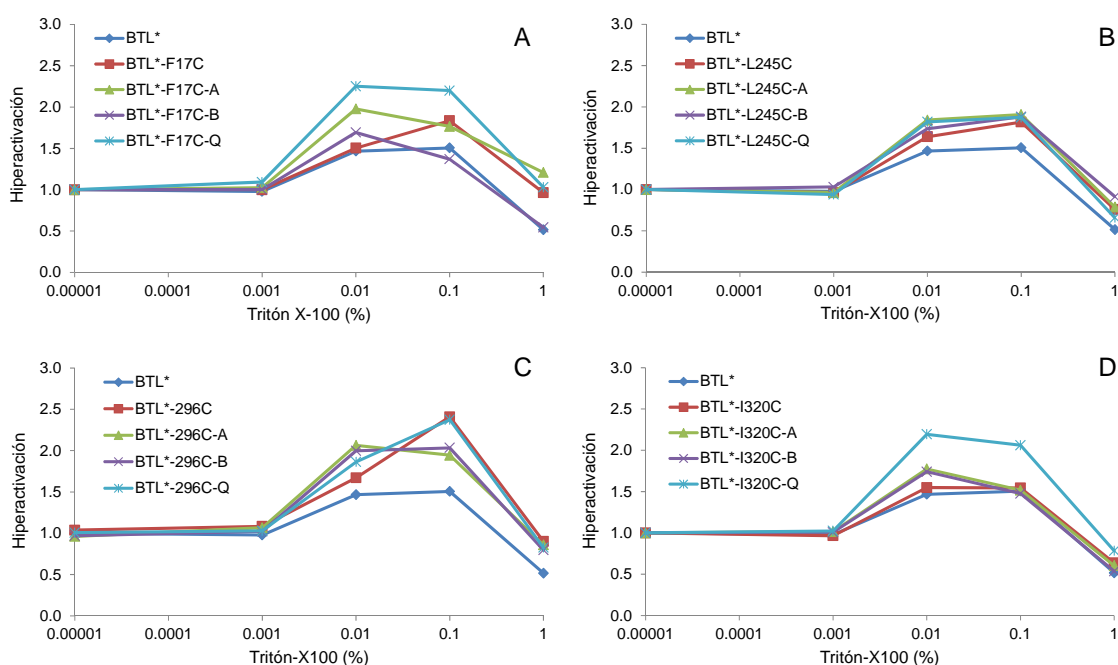


Figura 4.4 Perfiles de hiperactivación de las distintas lipasas artificiales de BTL*-F17C y sus variantes TL. A) BTL*-L245C y sus variantes; C) BTL*-L296C y sus variantes; D) BTL*-I320C y sus variantes

En cambio, no se aprecia un efecto de la modificación química sobre la hiperactivación en el caso de la variante BTL*-L245C, no existiendo diferencias significativas entre los perfiles antes o después de ser modificada. El mutante BTL-I320C tampoco muestra cambios significativos en los perfiles de hiperactivación, salvo por la variante modificada BTL-320C-C, la cual se hiperactiva alrededor de 2.2 veces en comparación a BTL*.

Como se ha mencionado previamente, la Phe17 es el único aminoácido del interior de la cavidad catalítica de BTL que presenta un cambio de orientación entre la conformación cerrada y abierta de la

lipasa (Carrasco-Lopez et al. 2009). Es posible que las distintas modificaciones realizadas en este aminoácido afecten, aunque sea ligeramente, el mecanismo de activación de la lipasa. Algo similar podría ocurrir con la Cys296, que al encontrarse en la “boca” de la cavidad catalítica pudiese interaccionar de alguna forma con el lid.

4.4. Estudio de la enantioselectividad de los nuevos catalizadores modificados químicamente

Se estudió el efecto de modificaciones en el sitio activo de BTL sobre la enantioselectividad de la lipasa. Se utilizaron como modelo 2 esteres racémicos: ácido 2-hidroxi-4-fenilbutirato de etilo (HPBet) (6) y ácido 2-O-butiril-2-fenilacético (7); ambos importantes intermediarios en industria farmacéutica y química.

Como primer punto la biblioteca de catalizadores fueron estudiados en la resolución cinética de (6). Las reacciones se realizaron a pH 7.0 y pH 5.0, evaluando la velocidad específica y la enantioselectividad de los catalizadores. Los resultados se muestran en la Figura 4.5.

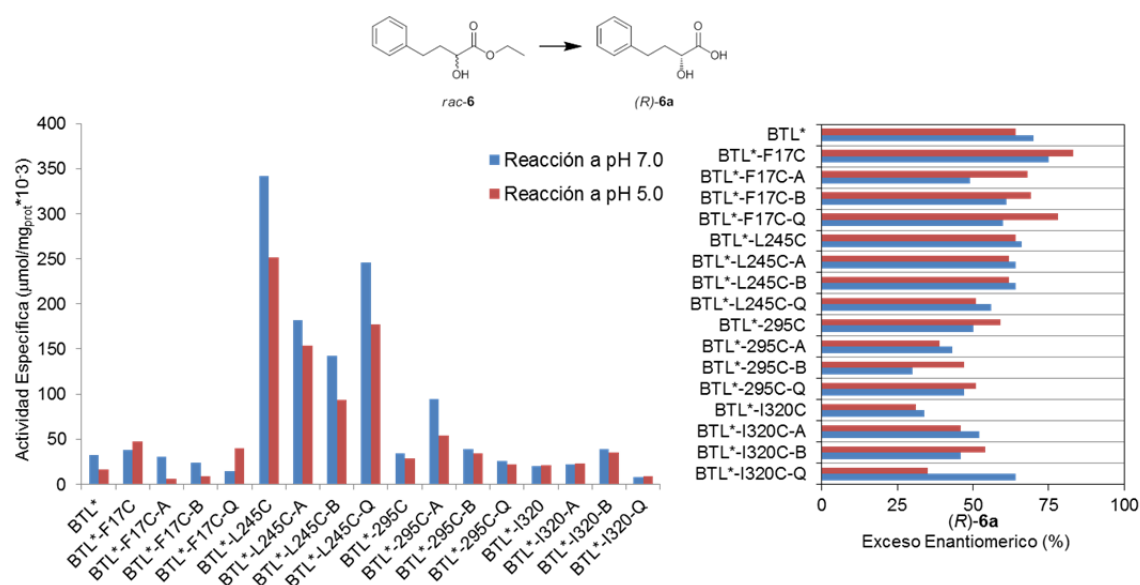


Figura 4.5 Resolución cinética de (6) catalizada por la biblioteca de catalizadores de BTL modificados en el sitio activo. A) Actividad específica; B) Exceso enantiomérico (e.e.)

Al analizar los resultados de los catalizadores modificados en la posición 17, se observa que la mutación genética promueve una mejora en la actividad de un 20% y de cerca de 300% para pH 7.0 y 5.0, respectivamente. En general la incorporación de los distintos MTS-X no mejora la actividad, incluso causa una disminución de esta. Sin embargo cuando la reacción se realizó a pH 5.0 utilizando el catalizador BTL*-F17C, se observa un aumento de la actividad de 2.5 veces en comparación a BTL*. Analizando la enantioselectividad, se observó una ligera mejora con BTL*-F17C y BTL*-F17C-Q a pH 5.0. El valor de e.e es incrementado desde un 64% con BTL* hasta un 83% y 78%, con BTL*-F17C y BTL*-F17C-Q.

En el caso de los catalizadores modificados en la posición 245, se puede observar un sustancial incremento en la actividad. BTL-245 muestra un incremento de la actividad en comparación a BTL* de 10 y 15 veces a pH 7.0 y pH 5.0, respectivamente. Esto representa un enorme incremento, sobre todo si se trata de una sola mutación. Las distintas modificaciones químicas introducidas en esta posición también muestran un incremento de la actividad pero en un mejor grado, entre 5-11 veces, dependiendo del compuesto y el pH de la reacción. Respecto a la selectividad no se observan cambios significativos con ninguno de los catalizadores modificados en esta posición.

Para el caso de los catalizadores modificados en una zona más externa de la cavidad catalítica, la posición 296, se observa que la mutación promueve una mejora en la actividad solo a pH 5.0, ya que a pH 7.0 la actividad en comparación a BTL* se mantiene prácticamente igual. Lo que se destaca es la mejora que se promueve al introducir los compuestos MTS-A y MTS-B en esta posición. Se puede observar que el catalizador BTL*-296C-A muestra un aumento de la actividad de alrededor de 3 veces en comparación con BTL*, a los dos pH estudiados. También se observa un aumento para BTL-296-B, el cual incrementa su actividad al doble a pH 5.0. Referente a la enantioselectividad, no se observaron mejoras para los catalizadores modificados en esta posición.

Por último al analizar los catalizadores modificados en la posición 320, al igual que en el caso anterior, las modificaciones con MTS-A y MTS-B promovieron una mayor actividad. Se destaca el catalizador BTL*-I320C-B, el cual mostró una actividad 2.4 veces mayor que BTL*. Por el contrario la modificación con MTS-Q en esta posición produce una fuerte disminución en la actividad, preservando solo un 10% de la actividad inicial, siendo el catalizador con menor actividad de toda la biblioteca.

En general, reemplazar un aminoácido presente dentro de la cavidad catalítica por una cisteína promueve fuertes cambios en la actividad frente al sustrato (6). En especial en la posición 245, generando un catalizador 15 veces más activo. Desafortunadamente, la inclusión de moléculas no naturales a la cisteína introducida no genera los cambios esperados para este sustrato. Se observó en general una disminución en la actividad específica frente a este sustrato, sin mejoras en la enantioselectividad. El único caso donde se observó una mejora mediante la introducción de MTS-X fue con el catalizador BTL*-296C-A, el que vio incrementada su actividad alrededor de 3 veces.

Aunque la estrategia de rediseñar el sitio activo de BTL no mostró los resultados esperados en la hidrólisis de (6), estos fueron prometedores demostrando que la estrategia de incorporar funcionalidades no naturales generó grandes cambios en las propiedades de la lipasa y una posición clave para el reconocimiento de este sustrato fue identificada (Leu245).

A continuación la biblioteca catalizadores fue estudiada en la resolución cinética de (7). De igual forma que el caso anterior la reacción se realizó a pH 7.0 y 5.0, evaluando la velocidad específica y la enantioselectividad de los catalizadores. Los resultados se muestran en la Figura 4.6

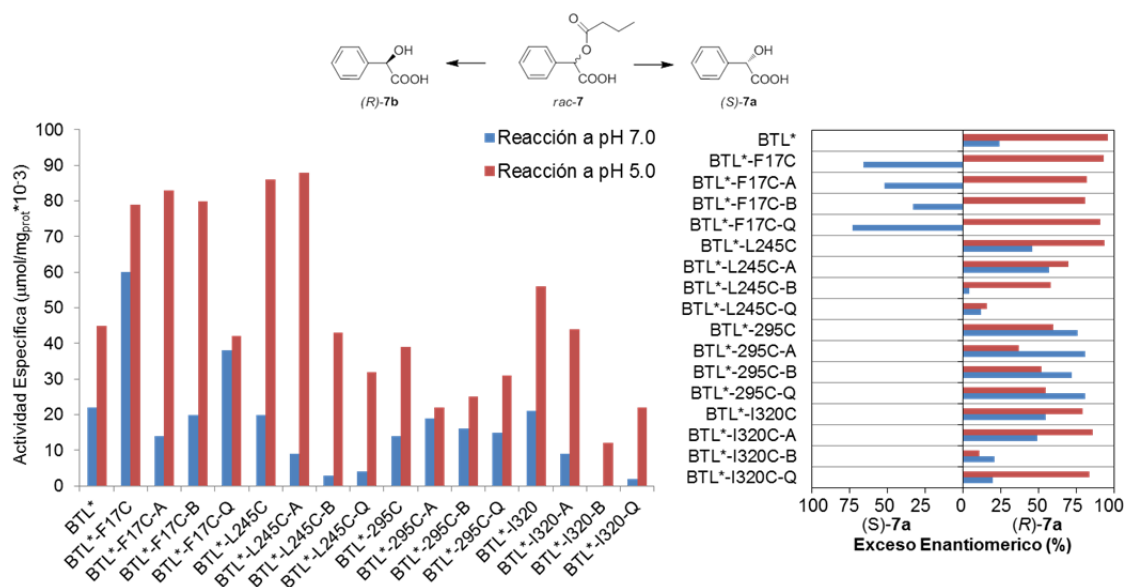


Figura 4.6 Resolución cinética de (7) catalizada por la biblioteca de catalizadores de BTL modificados en el sitio activo. A) Actividad específica; B) Exceso enantiomérico (e.e.)

Analizando los resultados se aprecia que BTL*-F17C muestra un incremento en la actividad de 2.7 veces a pH 7.0, y de 1.7 a pH 5.0, comparado con BTL*. La incorporación de los distintos MTS-X promovió distintos cambios en la actividad dependiendo del pH. Cuando la reacción se realizó a pH 7.0, la incorporación de MTS-A y MTS-B producen una disminución en la actividad, en cambio la inclusión de MTS-Q promueve un aumento de la actividad de 1.7 veces. Por el contrario, a pH 5.0 el fenómeno es inverso, los catalizadores modificados con MTS-A y MTS-B, muestran un incremento cercano al 1.7 veces (similar que BTL*-17), pero BTL-17-Q muestra un actividad levemente menor que BTL*.

El resultado más relevante es que la mutación F17C sorprendentemente invierte la enantioselectividad de la lipasa, generando *S*-7a como producto mayoritario a pH 7.0. Son escasos los ejemplos donde se ha podido revertir la enantioselectividad de una lipasa, y esto fue solo posible después de un exhaustivo trabajo de screening de mutantes mediante evolución dirigida (Zha et al. 2001; Engström et al. 2010; Wu et al. 2013). También ha sido descrito que mediante técnicas de inmovilización controlada e ingeniería del medio se ha revertido la enantioselectividad de una lipasa (Palomo et al. 2002a). Esto resalta más lo crucial de la Phe17 en la estructura del sitio activo de la lipasa BTL, y que una mutación y/o modificación en esta posición puede generar grandes cambios en las propiedades de la lipasa. En la siguiente sección se abordará más sobre esta posición.

Otro resultado que se destaca, que la incorporación de MTS-Q en BTL*-F17C produjo un incremento en la enantioselectividad, alcanzando un e.e. de 73% de *S*-7a. La modulación que produce el pH sobre este

catalizador es remarcable, a pH 7.0 generó un producto con un e.e. de 91% hacia el enantiómero R. Al realizar la reacción a pH 5.0, el catalizador también se mostró muy enantioselectivo con un e.e de 73% hacia el enantiómero S. Aunque se ha descrito que mediante ingeniería del medio es posible revertir la enantioselectividad del catalizador (Palomo et al. 2002a; Palomo 2008), no hay antecedentes de un cambio tan radical por solo cambiar en el pH.

Para BTL*-245C se observó una actividad similar a BTL* cuando la reacción se realiza a pH 7.0. Sin embargo cuando se realiza la modificación química en este punto se produce una fuerte caída en la actividad, y solo muestra una leve mejora en la enantioselectividad cuando la modificación es la incorporación de MTS-A. Por otro lado cuando la reacción se realiza a pH 5.0, BTL*-245C muestra el doble de la actividad de BTL*, conservando el valor de enantioselectividad. La incorporación de los distintos MTS-X produce aún más catalizador más activo y en todos los casos causan una merma en la enantioselectividad.

Referente a los distintos catalizadores modificados en la posición 296, al realizar la reacción a pH 7.0 se observa que en general se produce una leve disminución en la actividad (≈ 30), pero se produce un significativo aumento en la enantioselectividad alcanzando valores de e.e. cercanos al 80%. Cuando la reacción se realiza a pH 5.0, no se observó mejoras ni en la actividad y enantioselectividad.

Por último, el catalizador BTL*-I320C mostró una actividad similar a BTL*, independiente del pH. Sin embargo, la modificación química sobre este mutante, produce una fuerte disminución en la actividad, incluso BTL*-I320C-B no es activo frente a (7) cuando la reacción se realizó a pH 7.0.

A través de la combinación de mutagénesis de sitio dirigida y modificación química se logró el rediseño del sitio activo de BTL. Mediante esta estrategia se logró mejorar la enantioselectividad de la lipasa frente al sustrato (7). Se identificó que la mutación F17C promueve la inversión de la enantioselectividad de la lipasa a pH 7.0 y que una posterior modificación química sobre esta posición, permitió generar un catalizador (BTL*-F17C-Q) con notables propiedades enantioselectivas modulables por el pH.

4.5. Mutagénesis de saturación en el sitio activo de BTL: estudio del amino ácido F17

A partir de los resultados obtenidos con los distintos mutantes modificados químicamente, donde se ha observado que la mutación de la Phe17 produce una inversión en la enantioselectividad de la lipasa frente al sustrato (7), se decidió ahondar en este resultado. Como se ha mencionado anteriormente, la Phe17 es un aminoácido clave, ya que su abultada cadena lateral le otorga una forma de boomerang a la cavidad catalítica (Carrasco-Lopez et al. 2009). Basándose en esto se crearon distintos mutantes en la posición 17, buscando aminoácidos de cadenas menos abultadas de forma de aumentar la actividad catalítica.

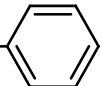
Se seleccionaron los siguientes mutantes: BTL*-F17, BTL*-F17C, BTL*-F17S, BTL*-F17A y BTL*-F17G. Adicionalmente, como curiosidad se estudió el mutante BTL-F17D y ver la influencia de la carga del ácido carboxílico de la cadena lateral.

A continuación, en cooperación con Dr. López-Gallego del Instituto de Catálisis (ICP), se procedió al diseño de primers, clonaje, expresión y purificación de los mutantes de BTL. Los diferentes mutantes de BTL en la posición 17 fueron expresados en E.coli, purificados e inmovilizados en agarosa activada con BrCN. En todos los casos con una carga enzimática de 5 mg de lipasa/g de soporte, obteniéndose rendimientos mayores de 95%.

a. *Caracterización de los mutantes*

A continuación a distintos mutantes en la posición 17 de BTL inmovilizados en BrCN-agarosa, se les determinó los parámetros cinéticos utilizando como sustrato pNPB. En la Tabla 4.4 se muestra un resumen de los distintos parámetros cinéticos de los mutantes de BTL estudiados.

Tabla 4.4. Resumen de los parámetros cinéticos de los distintos mutantes de BTL en la posición 17

Mutación		Actividad (UI/g)	K _m (mM)	K _{cat} (s ⁻¹)	K _m /K _{cat} (M ⁻¹ s ⁻¹)
—H	17G	149.8	41.7	9.27	220
—CH ₃	17A	160.4	30.0	9.93	330
—CH ₂ OH	17S	99.0	2.7	6.13	2260
—CH ₂ SH	17C	60.0	1.1	3.72	3310
—CH ₂ COOH	17D	7.7	0.8	0.47	590
—CH ₂ 	17F	44.4	1.2	2.75	2290

Como se observa en la Tabla 4.4, una disminución en el tamaño de la cadena lateral produce un aumento en la K_{cat}. El reemplazo de Phe por Cys promueve un leve incremento en la K_{cat} (35%). Sin embargo, cuando es reemplazado por un aminoácido levemente más pequeño, como el caso de Ser el aumento producido es de más de 2.2 veces. Así mismo, cuando Phe es reemplazado por una Ala ó Gly, se produce un significativo aumento en la K_{cat} de más de 3 veces. Esto confirma, la hipótesis inicial de que al introducir una cadena lateral más pequeña en la posición 17 es posible aumentar la actividad del catalizador, ya se promueve un mayor espacio para la acomodación de sustrato (Sandström et al. 2012).

Sin embargo como se observa en la Tabla 4.4, no solo la K_{cat} se ve aumentada sino también se produjo un cambio en la K_m . Por ejemplo, cuando se reemplaza Phe por Ala o Gly, se produce un dramático incremento de más de 25 veces en la K_m . Finalmente este incremento en la K_m , se traduce en una disminución de la eficiencia catalítica de la lipasa (K_{cat}/K_m).

Considerando este último punto, BTL-F17C y BTL-F17S se muestran como los mejores catalizadores. En ambos se produjo un aumento en la actividad catalítica, y para el caso de BTL-F17S este aumento se produce sin un desmedro en su eficiencia catalítica. Para el caso BTL-F17C, existe un significativo aumento en su eficiencia catalítica cercana al 50%.

b. Actividad y enantioselectividad frente al ester quiral (7)

Los distintos mutantes de BTL fueron evaluados en la resolución cinética de (7). De forma similar a lo previo descrito, la reacción se realizó a pH 7.0 y pH 5.0. Los resultados se muestran en la Figura 4.7.

Se pudo observar que la mutación F17D, al igual que con la actividad medida con pNPB, trae una fuerte caída en la actividad (alrededor de 90% de la actividad de BTL*-F17) sin mejoraras considerables en la selectividad. Por el contrario las otras mutaciones estudiadas, produjeron una mejora en las propiedades de la lipasa.

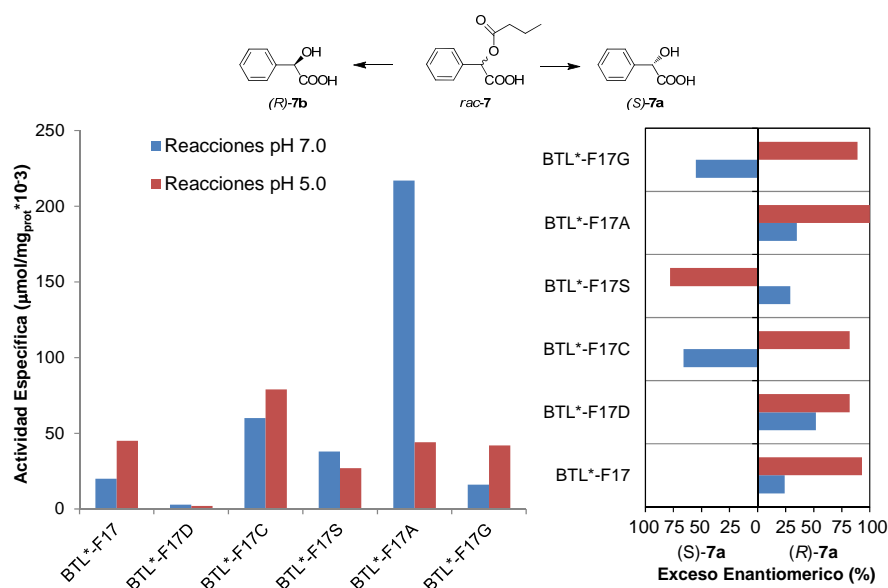


Figura 4.7 Resolución cinética de (7) con distintos mutantes de BTL en la posición 17.

Podemos observar que en términos de actividad se produjeron interesantes mejoras con respecto a BTL-F17. Podemos observar que BTL-F17C y BTL-F17S muestran un incremento en la actividad a pH 7.0, de 3 y 1.9 veces, respectivamente. Sin embargo, el aumento más significativo se produce con el mutante BTL-F17A, el cual muestra un aumento en la actividad de más de 10 veces a pH 7.0.

El resultado más destacado, es la posibilidad de modular la enantiopreferencia mediante una sola mutación en la posición 17. Se puede apreciar como a pH 7.0 los mutantes BTL*-F17C y BTL*-F17G muestran una enantioselectividad invertida con respecto al resto de las mutaciones, fue posible pasar de un e.e de 24% hacia *R*-(7a) con BTL-F17, hasta un 66% y 55% e.e. hacia *S*-(7a) con los mutantes señalados. De forma similar, cuando la reacción se realiza a pH 5.0 el mutante BTL-F17S mostró una inversión en la enantioselectividad, con un e.e. de 78% hacia *S*-(7a). Como se ha mencionado anteriormente, son escasos los ejemplos de inversión de la enantioselectividad descritos.

Por último, se destaca el resultado obtenido con el mutante BTL-F17A a pH 5.0. Este mutante fue capaz de hidrolizar de forma completamente enantioselectiva el sustrato 7 (e.e > 99). Se generó Adicionalmente, se muestra el transcurso de la reacción frente al tiempo, donde se puede observar que el mutante es capaz de producir de forma pura *R*-(7a).

5. Conclusiones

Mediante una estrategia combinada entre mutagénesis dirigida y modificación química dirigida fue posible modificar el sitio activo de BTL, rediseñándolo para mejorar sus propiedades catalíticas.

Objetivos específicos

- a. Se desarrolló exitosamente una estrategia para la modificación en fase sólida de una única cisteína introducida por mutagénesis en el del sitio activo de BTL.
- b. Mediante la introducción de grupos funcionales no naturales en la cavidad catalítica de BTL, el sitio activo de la lipasa fue rediseñado mejorando su actividad frente a pNPB y mostrando distintos perfiles de hiperactivación.
- c. Una biblioteca de catalizadores modificados químicamente en el sitio activo fue creado y aplicado exitosamente a la resolución cinética de esteres quirales.
- d. Se identificó que la mutación L245C tiene un fuerte efecto sobre la actividad de la lipasa frente al sustrato etil-2-hidroxi-4-fenilbutirato (6), aumentándola más de 15 veces. Se sugiere ahondar en los resultados, realizando más mutaciones en esta posición o introducir otros grupos funcionales.
- e. El mutante BTL*-F17C sorprendentemente invierte la enantiopreferencia de la lipasa cuando cataliza la hidrólisis de ácido (\pm)-2-O-butil-2-fenilacético (7), generando (S-7a) como producto mayoritario a pH 7.0.
- f. El catalizador BTL*-F17C-Q mostro notables propiedades enantioselectivas modulables por el pH. Este catalizador es capaz de generar (R-7a) con un e.e. de 91% cuando realiza cuando realiza la hidrólisis de 7 a pH 7.0 y de revertir su enantiopreferencia a pH 5.0 generando S-7a con un e.e de 73%.
- g. El reemplazo de aminoácidos de cadena lateral menos voluminosa permitió aumentar la actividad y la eficiencia catalítica de la lipasa en la hidrólisis de pNPB, obteniéndose los mejores resultados en términos de eficiencia catalítica (K_{cat}/K_m) con los mutantes BTL*-F17S y BTL*-F17C.
- h. El catalizador BTL*-F17A fue capaz de catalizar de forma completamente enantioselectiva la hidrólisis de (7).

Capítulo 5:

Desarrollo de catalizadores híbridos: Anclaje de complejos organometálicos en el sitio activo de lipasas inmovilizadas.

1. Introducción

Debido al rápido incremento de su demanda durante los últimos años, la síntesis de compuestos enantioméricamente puros para la producción de fármacos, agroquímicos, saborizantes, etc; es uno de los principales objetivos de la química sintética (Breuer et al. 2004; Wohlgemuth 2010). El uso de catalizadores enantioselectivos, ya sean heterogéneos, homogéneos o enzimáticos, es la estrategia más eficiente y atractiva. Dentro de estos, transformaciones catalizadas por metales de transición y complejos organometálicos han recibido mucha atención durante las últimas tres décadas (Dalko y Moisan 2004). Sin embargo, pese a los esfuerzos, el número de catalizadores organometálicos eficientes y altamente enantioselectivos es aún reducido (Blaser 2003; Deuss et al. 2011).

En paralelo, durante las últimas décadas el uso de catalizadores enzimáticos han emergido como una herramienta alternativa para la síntesis de compuestos enantioméricamente puros (Breuer et al. 2004; Faber 2011). Los procesos enzimáticos se caracterizan por su efectividad y selectividad, pero existen diversas transformaciones químicas realizadas industrialmente para las cuales no se dispone de enzimas naturales que lleven a cabo dichas transformaciones. De igual forma, importantes reacciones químicas se basan en funcionalidades que no tienen su equivalente en la naturaleza. Por ejemplo, catalizadores homogéneos basados en metales como Rh, Ru, Ir, Pd o Pt, metales que no se encuentran presentes metaloenzimas naturales.

En catalizadores convencionales basados en metales de transición tanto la actividad como la selectividad es proporcionada por la 1^{ra} esfera de coordinación, generada por el ligando quelante. Por el contrario, en la catálisis enzimática una 2^{da} esfera de coordinación basada en la combinación de las distintas interacciones proporcionada por la estructura proteica (puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, etc.) es quien contribuye a la actividad y selectividad. Es esta 2^{da} esfera de coordinación la responsable de la discriminación entre un enantiómero u otro.

Un nuevo y emergente enfoque es la combinación de una macromolécula, como péptidos, ADN, ARN o proteínas, con un complejo catalítico basado metales de transición. De esta forma, una 2^{da} esfera de coordinación es proporcionada por la macromolécula puede promover una regio-,quimio-y enantioselectividad (Figura 5.1). El resultado, un híbrido capaz de catalizar reacciones no presentes en la naturaleza como sustitución alílica, hidrogenación de oleofinas, metátesis y cicloadicciones con selectividades difícilmente alcanzables con catalizadores convencionales (Pordea y Ward 2009; Deuss et al. 2011; García-Fernández y Roelfes 2012).

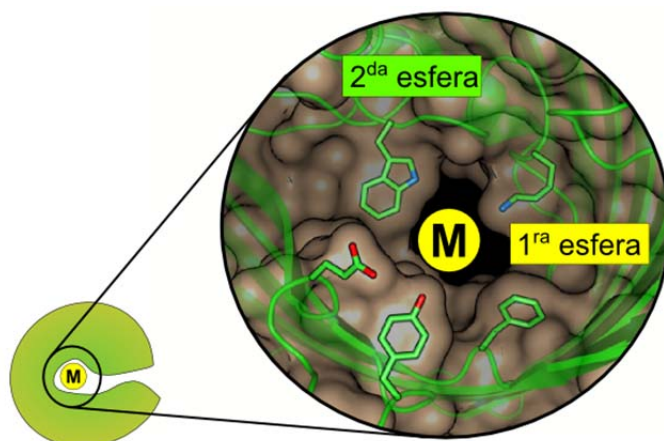


Figura 5.1 Esquema general de metaloenzimas artificiales: el complejo metal-ligando (M) proporciona la 1ª esfera de coordinación y la biomolécula donde es anclado proporciona la 2da esfera.

Durante la última década diversos ejemplos de conjugación de complejos organometálicos con péptidos, ADN y proteínas se ha reportado (Rosati y Roelfes 2010). En el caso de proteínas las estrategias más comúnmente utilizadas han sido el anclaje no covalente, que incluye anclaje supramolecular e interacciones dativo (por ejemplo Biotina-Estreptavidina); y el anclaje covalente. En el caso de anclaje covalente se basa en la modificación química covalente para incorporar el ligando en la cavidad de la proteína. A menudo se basa en la modificación específica de una cisteína, pero también se han utilizado aminoácidos no naturales.

Otra interesante estrategia es el uso miméticos de inhibidores irreversibles de enzimas para la conjugación proteína-organocatalizador. Basándose en el mecanismo de inhibición de la acetilcolinesterasa, se ha logrado construir y caracterizar un híbrido pincer-cutinasa (Kruithof et al. 2005). Esta estrategia para la creación de catalizadores híbridos ha sido escasamente estudiada, sin embargo puede presentar un interesante enfoque para la creación de metaloproteínas artificiales. A partir de distintas lipasas comerciales, previamente inmovilizadas y la adecuada estrategia de modificación en fase solida se podría construir de forma simple y sencilla una biblioteca de catalizadores híbridos.

2. Objetivos

Desarrollar un catalizador híbrido mediante el anclaje de un organocatalizador en el sitio activo de una lipasa previamente inmovilizada.

Objetivos específicos

- a. Desarrollo de una estrategia para la incorporación en fase sólida de un complejo organometálico de Pd en el sitio activo de distintas lipasas.
- b. Creación de una biblioteca de catalizadores híbridos a partir de diversas lipasas comerciales disponibles.
- c. Evaluación de los distintos catalizadores híbridos en las reacciones de Suzuki-Miyaura y Heck.

A partir de los resultados obtenidos se adicionó un objetivo específico adicional:

- d. Estudiar el efecto de la modificación de la superficie del soporte una vez la lipasa inmovilizada, sobre el comportamiento catalítico de los catalizadores híbridos.

3. Materiales y Métodos

3.1. Reactivos

Lipasa de *C. antarctica* B (CALB), lipasa de *T. lanuginosus* (TLL) fueron suministradas por Novozymes (Dinamarca). Lipasa de *P. fluorescens* (PFL) fue suministrada por Amano Pharmaceutical (Japon). Octil-agarosa 6BCL y BrCN-agarosa 4BCL fue proporcionado por GE Healthcare (Suecia). Sepabeads epóxido (SP-EC) fue suministrado por Resindion (Italia). Lewatit VO OC 1600 fue proporcionado por Lanxess (Alemania). Lipasas de *R. oryzae* (ROL), *R. miehei* (RML), p-nitrofenol butirato (pNPB) (1), ácido fenil borónico (10), iodobenceno (10a), bifenilo (10b), etil acrilato (11), cinamato de etilo (11a), etilendiamina (EDA), metilamina (NH_2CH_3), octilamina ($\text{NH}_2(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$), dodecilamina ($\text{NH}_2(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}_3$), TritonX-100 (Tx), bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB), Tetrabutilamonio bromuro (TBaBr), borohidruro de sodio (NaBH_4) y peryodato de sodio (NaIO_4) fueron suministrados por Sigma. El complejo organometálico de Pd (COM) fue sintetizado por el prof. Ángel Rumero Sánchez del departamento de Química Orgánica de la UAM, como previamente ha sido descrito (Kruithof et al. 2005). Otros reactivos fueron de grado analítico.

3.2. Purificación de lipasas comerciales

Las distintas lipasas comerciales fueron purificadas mediante adsorción interfacial a Octil-agarosa como previamente ha sido descrito (Fernandez-Lafuente et al. 1998). Brevemente, a 1 mL de una solución enzimática (10 mg/mL) en tampón fosfato 5 mM pH 7.0 se agregó 1g de Octil-agarosa, incubándolo por 3 h para luego filtrar y lavar con abundante agua. Posteriormente la lipasa fue desorbida del soporte añadiendo 20 mL de tampón fosfato 25 mM pH 7.0 con 0.5% (v/v) Triton-X100 por gramo de soporte. En el caso de TLL, la solución de tritón fue reemplazada por una solución 0.6% de CTAB.

3.3. Inmovilización en agarosa activada con Bromuro de cianógeno (BrCN).

La inmovilización en BrCN se realizó como esta descrito en la sección 3.4 del Capítulo 2 (pág. 44).

3.4. Inmovilización de lipasas en Lewatit

A 1 mL de una solución enzimática (10 mg/mL) en tampón fosfato 5 mM pH 7.0 se agregó 1 g de Lewatit-1600, incubándolo por 3h para luego filtrar y lavar con abundante agua.

3.5. Preparación de soportes Sepabeads-aldehídos (SP-CHO).

1 g de EC-EP Sepabeads® fue incubado en 10 mL de 0.5 M de H_2SO_4 . Luego de 2 h de incubación se filtra y lava con abundante agua destilada. A continuación, se procedió a oxidar los dioles producidos incubando 1 g del soporte en 10 mL de una solución 40 mM de NaIO_4 durante 2 h, posteriormente se filtró y lavó con abundante agua destilada.

3.6. Inmovilización en soportes Sepabeads-aldehídos (SP-CHO).

A 10 mL de la solución enzimática purificada de CALB (1 mg/mL) en 100 mM de bicarbonato de sodio pH 10.05 se añadió 1 g del soporte y se incubó por 24 h. A continuación se redujo adicionando 10 mg de NaBH₄ por 30 minutos. Posteriormente se filtró y se lavó con abundante agua.

3.7. Inmovilización en soportes Sepabeads-aldehídos (SP-CHO) y funcionalización de su superficie.

Como se discutirá más adelante, para evitar efectos de partición entre los sustratos y el catalizador se funcionalizó la superficie del soporte luego de la inmovilización de la enzima. Brevemente, a 10 mL de la solución enzimática purificada de CALB (1 mg/mL) en 100 mM de bicarbonato de sodio pH 10.05 se añadió 1 g del soporte SP-CHO y se incubó por 24 h. A continuación sin lavar, se filtró y se adicionó 10 mL de una solución para bloquear el soporte. Las soluciones estudiadas fueron: 100 mM bicarbonato de sodio pH 10.05 (SP-CALB), metilamina 500 mM pH 10.05 (SP-CALB-C), octilamina 500 mM en 20% (v/v) de dioxano pH 10.05 (SP-CALB-C₈), dodecilamina 500 mM en 40% (v/v) de dioxano pH 10.05 (SP-CALB-C₁₂) y etilendiamina 500 mM pH 10.05 (SP-CALB-EDA). A continuación se redujo adicionando 10 mg de NaBH₄ por 30 minutos. Posteriormente se filtró y se lavó con 20 mL de una solución 40% (v/v) de dioxano en agua. Por último se lavó con abundante agua.

3.8. Ensayo de actividad Enzimática (pNPB)

La actividad enzimática se cuantificó como está descrito en la sección 3.7 del Capítulo 1 (pág. 25).

3.9. Inhibición irreversible de los catalizadores por dietil-p-nitrofenilfosfato (D-pNP)

La inhibición con D-pNP se realizó como está descrito en la sección 3.7 del Capítulo 2 (pág. 45)

3.10. Incorporación del complejo organometálico COM

0.2 g de los diferentes catalizadores de lipasa fueron suspendidos en 4 mL de tampón fosfato 25 mM pH 7.0 a 25°C. Luego a esta solución se añadió 1.5 mM del complejo organometálico (COM) y se mantuvo en agitación suave, midiendo periódicamente la actividad enzimática. El rendimiento de la modificación se cuantificó mediante la actividad remanente de los catalizadores.

Para eliminar cualquier actividad lipásica remanente, los catalizadores fueron incubados por 3 h en una solución de D-pNP, tal como se indica anteriormente en la sección 3.7 del Capítulo 2 (pág. 45)

3.11. Síntesis de bifenilo mediante la reacción de Suzuki-Miyaura.

En un vial con tapa rosca de 1.5 mL, que contenía una solución de TBaBr (53 mg, 0.165 mmol), ácido fenil borónico (10) (67 mg, 0.55 mmol) y iodobenceno (10a) (102 µL, 0.5 mmol) en 500 µL de MeOH, se añadió 200 mg del catalizador seleccionado. La mezcla fue precalentada a 50°C bajo vigorosa agitación

magnética por 5 min. Después, para iniciar la reacción se añadió 500 mL de una solución 500 mM de NaOH (30 mg, 0.75 mmol) en agua destilada. La suspensión final se mantuvo en agitación magnética vigorosa a 50°C. El transcurso de la reacción fue monitoreado mediante HPLC, tomando muestras a diferentes tiempos. La conversión de la reacción se analizó mediante HPLC en fase reversa (Spectra Physic SP 100 acoplado con un detector UV Spectra Physic SP 8450). Se empleó una columna Kromasil C4 (25x0.4 cm) suministrada por Análisis Vínicos. Como fase móvil se utilizó una mezcla isocrática de 50% (v/v) acetonitrilo en agua miliQ con un flujo de 1.5 mL/min. La detección UV se realizó a 254 nm. El rendimiento se obtuvo mediante una curva de calibrado del producto (11b) de la reacción.

3.12. Síntesis de cinamato de etilo mediante la reacción de Suzuki-Miyaura.

En un vial de 1.6 mL con tapa rosca, que contenía una solución de iodobenceno (10a) (30,6 µL, 0.274 mmol) y de etil acrilato (11) (59 µL, 0.55 mmol) en DMF o en una mezcla DMF/agua destilada (volumen final 1 mL), se añadió 200 mg del catalizador seleccionado. La mezcla fue precalentada a 70°C bajo vigorosa agitación magnética por 5 min. Después, para iniciar la reacción se añadió trietilamina (57 µL, 0.412 mmol). La suspensión final se mantuvo en agitación magnética vigorosa a 70°C. El transcurso de la reacción fue monitoreado mediante HPLC, tomando muestras a diferentes tiempos. La conversión de la reacción se analizó mediante HPLC en fase reversa (Spectra Physic SP 100 acoplado con un detector UV Spectra Physic SP 8450). Se empleó una columna Kromasil C4 (25x0.4 cm) suministrada por Análisis Vínicos. Como fase móvil se utilizó una mezcla isocrática de 50% (v/v) acetonitrilo en agua miliQ con un flujo de 1.5 mL/min. La detección UV se realizó a 254 nm. El rendimiento se obtuvo mediante una curva de calibrado del producto (11a) de la reacción.

4. Resultados

4.1. Desarrollo de metaloproteínas artificiales.

El principio básico de este capítulo fue que la inserción sitio específica de un complejo organometálico (COM) en el sitio catalítico de un enzima conlleva a la creación de un catalizador híbrido con una nueva actividad catalítica. De esta forma se diseñó un COM modificado de forma que pudiese reaccionar específicamente con la Ser catalítica de distintas lipasas. El diseño se basa en el mecanismo de reacción de los inhibidores de la acetilcolinesterasa (Figura 5.2), que son compuestos organofosforados que reaccionan específicamente con la Ser catalítica de distintas hidrolasas, especialmente esterasas y lipasas. Este diseño permite el anclaje específico a distintas enzimas de manera sencilla, que pueden ofrecer una 2^{da} esfera de coordinación distinta dependiendo de las características del sitio activo de la enzima para crear distintos catalizadores híbridos. A partir de esto y en colaboración con el prof. Ángel Rumbero Sánchez del departamento de Química Orgánica de la UAM, se ha sintetizado el COM de forma similar a lo previamente descrito (Kruithof et al. 2005).

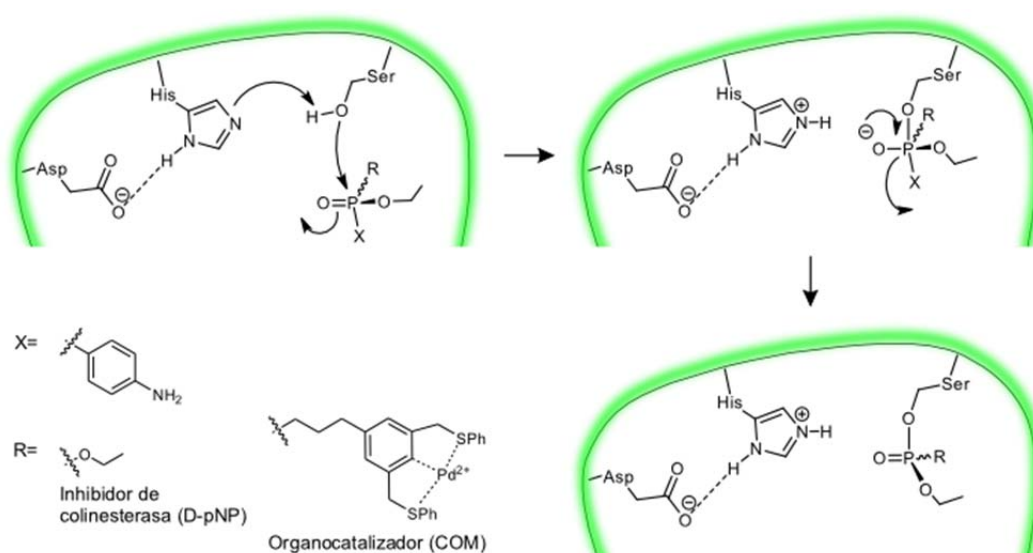


Figura 5.2 Mecanismo de acción de inhibidor de acetilcolinesterasa (D-pNP) y de anclaje del complejo organometálico (COM).

Se seleccionaron 6 lipasas comercialmente disponibles para ser modificadas con COM. Basándose en las diferencias estructurales de cada proteína se seleccionaron las siguientes lipasas: *C. antarctica B* (CALB), *T. lanuginosus* (TLL), *R. miehei* (RML), *R. oryzae* (ROL) y *P. fluorescens* (PFL). Las distintas lipasas fueron purificadas e inmovilizadas en agarosa activada con BrCN, en todos los casos con una carga enzimática de 5 mg de lipasa/g de soporte, obteniéndose rendimientos mayores de 95%.

Las distintas lipasas inmovilizadas fueron modificadas con COM (Figura 5.3). Como el COM- es un análogo a un inhibidor irreversible, este se inserta en la Serina catalítica inactivándola completamente,

4.2. Evaluación funcional de los catalizadores híbridos en la reacción de Suzuki.

Los distintos catalizadores híbridos fueron evaluados en la reacción de Suzuki-Miyaura en medio acuoso. Como reacción modelo se eligió la síntesis de bifenilo a partir de iodobenceno y ácido fenil borónico.

En una primera instancia se seleccionaron los catalizadores BrCN-CALB-COM, BrCN-TLL-COM y BrCN-CRL-COM ya que son los que representaban los mejores rendimientos de modificación y sus estructuras son muy diferentes. En la Tabla 5.1 se muestran los resultados, se observó que ninguno de los catalizadores se mostró activo a las condiciones de reacción. Sin embargo COM fue capaz de catalizar la reacción, alcanzado un rendimiento del 100% después de 70 h de reacción.

Tabla 5.1 Reacción de Suzuki-Miyaura catalizada por COM y distintos catalizadores híbridos^a.

<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center; margin-top: 10px;"> <div style="text-align: center;"> <chem>c1ccccc1B(O)O</chem> 10 </div> <div>+</div> <div style="text-align: center;"> <chem>c1ccccc1I</chem> 10a </div> <div>→</div> <div style="text-align: center;"> <chem>c1ccccc1-c2ccccc2</chem> 10b </div> </div>				
	Catalizador	Tiempo (h)	Rendimiento (%)	TOF (min ⁻¹)
1	COM	70	100	0.11
2	BrCN-CALB-COM	70	0	n.d
3	BrCN-TLL-COM	70	0	n.d
4	BrCN-RML-COM	70	0	n.d

^a La reacción se realizó en 50% (v/v) de MeOH en agua a una temperatura de 50 °C.

Al observar que los catalizadores híbridos no eran activos, se evaluaron distintos parámetros como relación entre reactivos y catalizador, presencia de distintas cantidades de distintos solventes orgánicos miscibles en agua, presencia de varios aditivos (detergentes, catalizadores de transferencia de fase) y temperaturas. Desafortunadamente, en ninguno de los casos se logró un rendimiento significativo con los catalizadores híbridos (<10%).

La agarosa como soporte de inmovilización presenta muchas ventajas (Mateo et al. 2005; Mateo et al. 2007), sin embargo uno de sus inconvenientes es que no es posible utilizarlo en altas concentraciones de solvente. Es por esto que se decidió cambiar el soporte de inmovilización por soportes más compatibles con el uso de solventes orgánicos, Lewatit y Sepabeads, lo que permitiría una mayor flexibilidad al momento de estudiar las condiciones de reacción.

Como no fue posible obtener resultados positivos, se decidió evaluar la actividad de COM en una reacción más compatible con el mecanismo catalítico de la formación de enlaces C-C con Pd bivalente se ha decidido utilizar la reacción de Heck en medio orgánico.

4.3. Evaluación funcional de los catalizadores híbridos en la reacción de Heck.

A continuación en cooperación con Dr. Marco Filice del Instituto de Catálisis (ICP) se procedió al estudio de catalizadores híbridos en la reacción de Heck.

Inicialmente se estudió los parámetros de la reacción exclusivamente con el complejo ligando-metal en solución. Los resultados se muestran en la Tabla 5.2. Se observó que COM era muy activo en DMF puro a 120°C, catalizando la reacción con un TOF de 3.83 min⁻¹. Sin embargo, en busca de condiciones de reacción más compatibles con la catálisis enzimática y química verde, se redujo la temperatura y el porcentaje de solvente. Se observó que a una temperatura de 70°C y en una mezcla de 25% de agua en DMF fue posible alcanzar un rendimiento del 100%, un aumento en el porcentaje de agua trae consigo una disminución en el rendimiento final de la reacción, alcanzando solo un 47% de rendimiento de 11a.

Una vez optimizadas las condiciones de reacción con COM, se seleccionó la lipasa CALB ya que es posible incorporar el pincer organometálico de forma cuantitativa en pocos minutos. La lipasa fue inmovilizada en un soporte Lewatit 1600, con un carga enzimática de 10 mg de lipasa /g de soporte, obteniéndose un rendimiento sobre el 95%. Adicionalmente se el pincer fue incorporado al catalizador comercial Novozym435, que es la lipasa CALB inmovilizada en Lewatit 1600. Este catalizador ha sido ampliamente utilizado en solventes orgánicos, y posee una elevada carga enzimática (30 mg lipasa por g de soporte) (Cabrera et al. 2009). La incorporación de COM en ambos casos fue cuantitativa.

Tabla 5.2. Optimización de las condiciones de Reacción de Heck catalizada por COM y distintos catalizadores híbridos.

	10a	11		11a	
	Catalizador	Agua (% v/v)	Temperatura (°C)	Rendimiento (%)	TOF (min ⁻¹)
1	COM	0	120	100	3.83
2	COM	0	70	0	nd
3	COM	25	70	100	2.38
4	COM	50	70	47	n.d
5	Lewatit-CALB-COM	25	70	0	n.d
6	Novozym435-COM	0	70	0	n.d
7	Novozym435-COM	25	70	0	n.d

Los resultados de los estos nuevos catalizadores híbridos se muestran en la Tabla 5.2. Se observó que ninguno de los dos híbridos fueron capaces de catalizar la reacción. Aunque Novozym435 ha sido ampliamente utilizado en solventes orgánicos (ref), es posible que las condiciones de reacción fueron muy agresivas para la lipasa, pudiendo ocasionar la inactivación e incluso la desorción de la lipasa del soporte. Para confirmar, si existía algún tipo de desorción de la lipasa del soporte en las condiciones de

reacción, se estudió la estabilidad del híbrido Novozyme435-COM a las condiciones de reacción. En la Figura 5.4 se muestra la electroforesis del catalizador luego de unas pocas horas de incubación en DMF o una mezcla DMF/agua. Se pudo observar que en ambas condiciones la proteína se desorbe del soporte. Eso explicaría porque el híbrido es incapaz de catalizar la reacción de Heck.

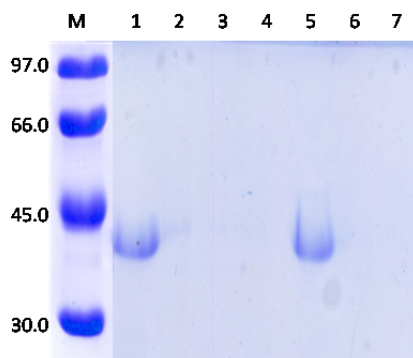


Figura 5.4. Electroforesis de los catalizadores híbridos. Novozyme435-COM (L1); Novozyme435-COM incubado en una solución 25%/75%:H₂O/DMF a 70°C durante 2h (L2), 6h (L3) y 24h (L4). Novozyme435-COM incubado en DMF a 70°C durante 2h (L5), 6h (L6) y 24h (L7).

A partir de los resultados anteriores se decidió, cambiar el método de inmovilización de la lipasa, por un método de inmovilización covalente para evitar la desorción de la proteína. Se seleccionó la unión covalente a soportes activados con grupos aldehídos mediante las lisinas de la lipasa, utilizando con soporte Sepabeads debido a su versatilidad en solventes orgánico.

La lipasa CALB fue inmoviliza en Sepabeads activada con grupos aldehídos mediante aminación reductiva, con una carga enzimática de 10 mg de lipasa/g de soporte, obteniéndose rendimientos mayores de 95%. Posteriormente, se modificó específicamente con el complejo organometálico obteniéndose una modificación cuantitativa.

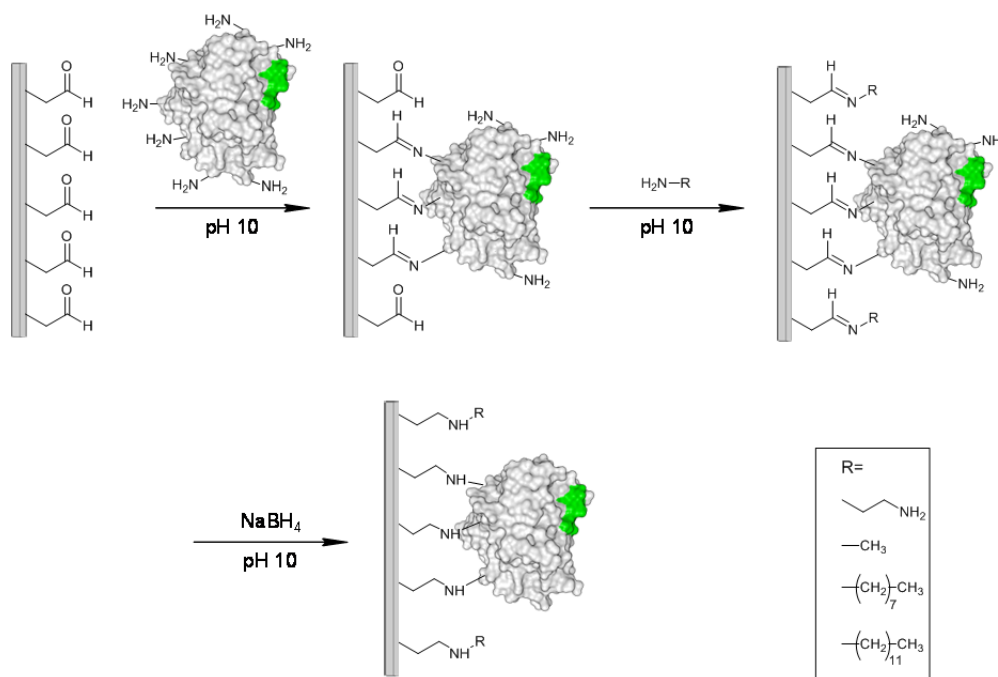
El catalizador híbrido preparado en fase solida (SP-CALB-COM) fue probado en la síntesis de etil cinamato en las condiciones previamente estudiadas (Tabla 5.3), observándose que cataliza eficientemente la reacción. Se utilizaron 3 concentraciones de agua, observándose un rendimiento del 100% cuando la reacción se realiza con 25% de agua. A las otras dos concentraciones de agua estudiadas también fue posible catalizar la reacción pero con rendimientos inferiores de 28 y 47% con 0% y 50% de agua, respectivamente.

En comparación a los resultados utilizando el complejo COM en solución (Tabla 5.2), podemos observar que COM no pudo catalizar la reacción en un medio anhidro, a diferencia de SP-CALB-COM que obtuvo un 28% de rendimiento de 11a. Cuando la reacción se realiza con un 25% de agua, se logra una conversión cuantitativa, aunque el TOF de SP-CALB-COM es levemente menor que COM.

Tabla 5.3. Reacción de Heck catalizada por COM y distintos catalizadores híbridos.

	Catalizador	Agua (%)	Modificación Superficie	Rendimiento (%)	TOF (min^{-1})
1	SP-CALB-COM	0	-	28	n.d
2	SP-CALB-COM	25	-	100	1.83
3	SP-CALB-COM	50	-	47	n.d
4	SP-CALB-EDA-COM	25	NH ₂	5	n.d
5	SP-CALB-C-COM	25	CH ₃	35	n.d
6	SP-CALB- C ₈ -COM	25	(CH ₂) ₇ CH ₃	100	2.55
7	SP-CALB- C ₁₂ -COM	25	(CH ₂) ₁₁ CH ₃	100	2.23

A la fecha no existen reportes del uso de enzimas artificiales inmovilizadas, por lo que se desconoce el efecto que la inmovilización de la proteína pueda tener sobre el comportamiento general del catalizador. Sin embargo existen evidencias del uso de complejos organometálicos soportados en distintas matrices y soportes (Littke y Fu 2002; Polshettiwar y Molnár 2007), donde la superficie del soporte tiene una importante contribución en la minimización de efectos de partición.

**Figura 5.5** Esquema de la inmovilización de CALB en SP-CHO y posterior modificación de la superficie del soporte.

Bajo esta hipótesis se diseñó una estrategia de Ingeniería del soporte, donde se modificó la superficie del soporte una vez la enzima inmoviliza. Un esquema general se muestra en la Figura 5.5, donde el soporte se bloquea con distintos alquinos de distinta longitud de cadena. Adicionalmente de forma de evaluar si la polaridad de la superficie del soporte tiene una influencia sobre el rendimiento final de la reacción se estudió el bloque con grupos aminos. De esta forma se prepararon 4 catalizadores adicionales que fueron evaluados en la reacción de Heck, los resultados se muestran en la Tabla 5.3.

La modificación de la superficie del soporte en los catalizadores híbridos de CALB promovió diferentes cambios en el rendimiento final de 11a. Se observó que cuando se el soporte se bloqueó con grupos aminos, se produjo una importante disminución en el rendimiento alcanzando solo un 5%. Un resultado similar se obtuvo cuando se bloquea con una pequeña cadena alifática (SP-CALB-COM-C). Por el contrario, cuando se bloquea la superficie del soporte con cadenas alifáticas de mayor longitud, se alcanza rendimientos del 100% en un menor tiempo, lo que repercute en un aumento del TOF. El mejor resultado se observó con SP-CALB-COM-C₈, con un TOF de 2.55 min⁻¹, que representa un aumento del 40% en comparación al catalizador sin modificación en su superficie (SP-CALB-COM). El uso de cadenas alifáticas de mayor longitud (C₁₂) también promovió un aumento del TOF, en valores cercanos al 20%.

Posiblemente, este importante incremento en el TOF se deba a disminución en los fenómenos de partición de los sustratos. Esto representa un importante punto de optimización, generalmente la optimización de este tipo de catalizadores se ha realizado utilizando diferentes ligandos, espaciadores o mediante evolución dirigida de la proteína huésped (Letondor et al. 2006; Pordea y Ward 2008; Reetz 2009). Existen diversos reportes de enzimas inmovilizadas donde la superficie del soporte juega un papel importante en el comportamiento catalítico debido a los efectos de partición que provocan (Cabrera et al. 2007; Fernández-Lorente et al. 2007; Cabrera et al. 2008).

Por último de forma de evaluar el potencial industrial de este catalizador híbrido, se realizó el estudio del reciclaje del catalizador, realizando 3 ciclos de reacción con SP-CALB-COM-C₈. Como se muestra en la Figura 5.6, se observó una disminución en el rendimiento final después de cada ciclo de reacción. En un primer ciclo se logró un 100% de rendimiento de 11a, para luego caer a un 68% y 15%, en el segundo y tercer ciclo, respectivamente.

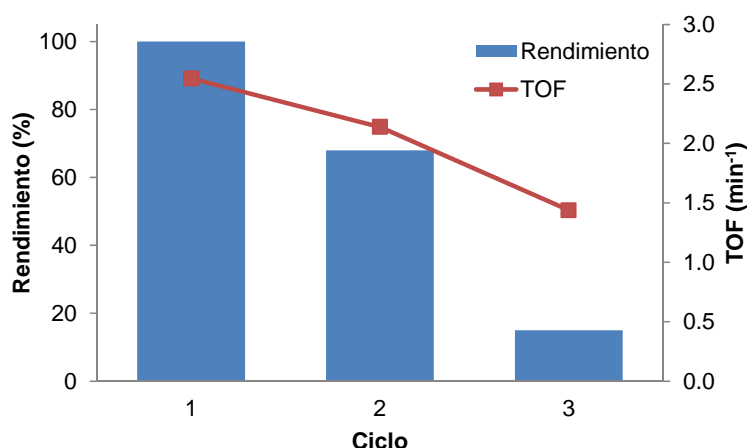


Figura 5.6. Reciclaje del catalizador híbrido SP-CALB-C₈-COM en la síntesis de cinamato de etilo (11a) a través de la reacción de Heck.

Esta caída en la actividad del catalizador luego de su reuso, se podría explicar debido al leaching del Pd del ligando. Existen evidencias de que ligandos del tipo SCS no son estables durante la reacción de Heck y que solo actuando solo como precatalizadores, siendo la especie catalítica el Pd⁰ (Yu et al. 2005). Pese

a este resultado, SP-CALB-C₈-COM es capaz catalizar la reacción a lo menos durante 2 ciclos con rendimientos elevados.

Esta estrategia puede ser fácilmente extensible para otras lipasas, o serina proteasas para la creación de una biblioteca de catalizadores para distintas reacciones catalizadas por Pd. Así mismo, esta misma estrategia podría ser utilizada para otro tipo de ligandos con otros metales y diferentes tipos de reacciones.

5. Conclusiones

Se ha creado con éxito un catalizador híbrido mediante el anclaje de un organocatalizador de Pd en el sitio activo de una lipasa previamente inmovilizada.

- a. Se desarrolló exitosamente una estrategia para la creación de metaloenzimas artificiales en fase sólida, utilizando lipasas inmovilizadas como huésped para el complejo organometálico obteniéndose rendimientos cuantitativos para la mayoría de las lipasas estudiadas.
- b. El catalizador híbrido SP-CALB-COM eficiente la reacción de Heck, con un rendimiento del 100% y un TOF de 1.83 min⁻¹.
- c. Se logró un incremento del 40% en el TOF mediante una estrategia de optimización de la superficie del soporte híbrido. El mejor resultado se obtuvo cuando el soporte fue bloqueado con octil-amina SP-CALB-COM-C8. Esto representa una interesante estrategia para la optimización de catalizadores como metaloproteínas artificiales.
- d. Se demostró que el anclaje en el sitio activo de un organometálico mediante el uso de un mímico de un inhibidor de acetilcolinesterasa es una interesante, sencilla y entendible estrategia para creación de distintas metaloproteínas artificiales.

Conclusiones Generales

Conclusiones Generales

En la presente Tesis Doctoral a través de un enfoque multidisciplinar conjugando e integrando distintas herramientas biotecnológicas, como el diseño racional, estudios bioinformáticos, síntesis en fase sólida, mutagénesis dirigida y química de proteínas se han desarrollado con éxito diversas estrategias de modificación química dirigida en fase sólida para la mejora de las propiedades catalíticas de distintas lipasas. Mediante la aplicación de estas estrategias fue posible mejorar y/o modular diversas propiedades catalíticas de diferentes lipasas como: actividad, estabilidad, especificidad, regio- y enantioselectividad.

A través de los beneficios del uso de las herramientas de la síntesis en fase sólida en la modificación de proteínas, permitiendo general protocolos de modificación química con elevados rendimientos (en su mayoría cuantitativos), de manera sencilla y de fácil implementación. Un punto muy importante, los nuevos protocolos de modificación química en fase sólida desarrollados en esta Tesis Doctoral son completamente extensibles a otras enzimas o proteínas, así también para otro tipo de aplicaciones.

Además podemos resaltar algunas de las conclusiones más relevantes.

- a. Se desarrolló de una estrategia de glicosilación química mediante la incorporación selectiva de dextranos-aldehídos en el N-terminal de la lipasa de *C. antarctica* mediante un proceso de aminación reductiva. Además, mediante dicroísmo circular y espectrometría de fluorescencia se pudo observar interesantes cambios en la estructura secundaria y terciaria de las lipasas glicosiladas. Estas nuevas lipasas glicosiladas mostraron propiedades mejoradas, destacándose CALB-Dext1500 con elevada actividad de síntesis en la transesterificación de glicerina. Esta lipasa glicosilada fue capaz de sintetizar 2-gliceril-butirato (3a) con un 80% de rendimiento al 100% de conversión, un importante incremento en comparación a la lipasa sin modificar (57%). Esta simple modificación química presenta un gran potencial como técnica para diseñar nuevos biocatalizadores de lipasas, y enzimas en general, con aplicaciones en química fina y farmacéutica.
- b. Mediante la apropiada combinación de herramientas bioinformáticas, biología molecular y química de proteínas fue posible modificar el equilibrio de la entre las conformaciones abierta y cerrada de la lipasa de *G. Thermocatenolatus* mediante la exitosa ligación de dos cisteínas introducidas genéticamente en la zona del lid. La ligación de las dos cisteínas promovió cambios estructurales cambios estructurales que favorecen una nueva conformación, parcialmente abierta incluso en ausencia de detergentes o superficies hidrofóbicas. Este nuevo catalizador, BTL-DSSD, presentó importantes mejoras en sus propiedades catalíticas, como el aumento en la enantioselectividad en la hidrólisis de dimetilfenilglutarico (4) de 68% con BTL-WT a más de 86% de e.e.

- c. Se desarrolló con éxito un método eficiente para la creación de lipasas semisintéticas en fase sólida mediante la incorporación selectiva en el lid de la lipasa de polímeros o péptidos a través de la ligación de intercambio disulfuro. Mediante dicroísmo circular y espectrometría de fluorescencia se pudo observar interesantes cambios en la estructura secundaria y terciaria de las nuevas lipasas artificiales. Adicionalmente, utilizando simulaciones de dinámica molecular se identificaron las posibles interacciones entre el péptido introducido y los aminoácidos de la lipasa, prediciendo los cambios conformacionales producidos. Estos cambios estructurales se tradujeron en significativas mejoras en las propiedades catalíticas, principalmente en la regio- y enantioselectividad en diversas biotransformaciones estudiadas. Se destaca BTL*-A193C-p1 que es capaz de catalizar la hidrólisis asimétrica de dimetil fenilglutarico con un exceso enantiomérico de >99%.
- d. A través de la combinación de mutagénesis de sitio dirigida y modificación química dirigida se rediseño el sitio activo de la lipasa BTL mediante la incorporación de grupos funcionales no naturales, con la finalidad de mejorar las propiedades catalíticas de la enzima. El uso de diferentes compuestos activados con MTS y distintos mutantes de BTL se logró crear una biblioteca de biocatalizadores para la resolución cinética de esteres quirales. Se identificó que el mutante BTL*-F17C sorprendentemente invierte la enantiopreferencia de la lipasa cuando cataliza la hidrólisis de ácido (\pm)-2-O-butil-2-fenilacético (7). La posterior modificación de este mutante con MTS-Q, generó un nuevo catalizador con notables propiedades enantioselectivas modulables por el pH. Este catalizador es capaz de generar (R-7a) con un e.e. de 91% cuando realiza la hidrólisis de (7) a pH 7.0 y de revertir su enantiopreferencia a pH 5.0 generando S-7a con un e.e. de 73%.
- e. Se desarrolló exitosamente una estrategia para la creación de metaloenzimas artificiales en fase sólida utilizando lipasas inmovilizadas. Basándose en el mecanismo de inhibición de la acetilcolinesterasa, se ha logrado anclar un complejo organometálico de Pd (COM) en el sitio activo de diversas lipasas inmovilizadas. El nuevo catalizador híbrido SP-CALB-COM se mostró activo en la reacción de Heck, catalizando cuantitativamente la síntesis de cinamato de etilo (11a) con un TOF de 1.83 min⁻¹. A través de la optimización e ingeniería de la superficie se logró incrementar hasta en 40% el TOF. El mejor resultado se obtuvo cuando el soporte fue bloqueado con octil-amina, SP-CALB-COM-C8. Esto representa una interesante estrategia para la optimización de este tipo de catalizadores.

Referencias

Referencias

- Abian O, Wilson L, Mateo C, Fernández-Lorente G, Palomo JM, Fernández-Lafuente R, Guisán JM, Re D, Tam A, Daminatti M (2002) Preparation of artificial hyper-hydrophilic micro-environments (polymeric salts) surrounding enzyme molecules: New enzyme derivatives to be used in any reaction medium. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 19-20:295-303
- Andersson LO (1969) Reduction and reoxidation of the disulfide bonds of bovine serum albumin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 133 (2):277-285
- Antos JM, Francis MB (2004) Selective tryptophan modification with rhodium carbenoids in aqueous solution. *J Am Chem Soc* 126 (33):10256-10257
- Asad S, Khajeh K, Ghaemi N (2011) Investigating the structural and functional effects of mutating Asn glycosylation sites of Horseradish peroxidase to Asp. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 164 (4):454-463
- Baker NA, Sept D, Joseph S, Holst MJ, McCammon JA (2001) Electrostatics of nanosystems: Application to microtubules and the ribosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (18):10037-10041
- Ban H, Nagano M, Gavriluk J, Hakamata W, Inokuma T, Barbas CF (2013) Facile and stable linkages through tyrosine: Bioconjugation strategies with the tyrosine-click reaction. *Bioconjugate Chemistry* 24 (4):520-532
- Berglund P, Stabile MR, Gold M, Jones JB, Mitchinson C, Bott RR, Graycar TP (1996) Altering the specificity of subtilisin B. *lentus* by combining site-directed mutagenesis and chemical modification. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 6 (21):2507-2512
- Bernardes GJL, Chalker JM, Errey JC, Davis BG (2008a) Facile conversion of cysteine and alkyl cysteines to dehydroalanine on protein surfaces: Versatile and switchable access to functionalized proteins. *J Am Chem Soc* 130 (15):5052-5053
- Bernardes GJL, Grayson EJ, Thompson S, Chalker JM, Errey JC, El Oualid F, Claridge TDW, Davis BG (2008b) From disulfide- to thioether-linked glycoproteins. *Angewandte Chemie - International Edition* 47 (12):2244-2247
- Betz SF, Marmorino JL, Saunders AJ, Doyle DF, Young GB, Pielak GJ (1996) Unusual effects of an engineered disulfide on global and local protein stability. *Biochemistry* 35 (23):7422-7428
- Blaser HU (2003) Enantioselective catalysis in fine chemicals production. *Chemical Communications* 9 (3):293-296
- Bolivar JM, Rocha-Martin J, Mateo C, Cava F, Berenguer J, Fernandez-Lafuente R, Guisan JM (2009) Coating of soluble and immobilized enzymes with ionic polymers: full stabilization of the quaternary structure of multimeric enzymes. *Biomacromolecules* 10 (4):742-747. doi:10.1021/bm801162e
- Bornscheuer UT, Huisman GW, Kazlauskas RJ, Lutz S, Moore JC, Robins K (2012) Engineering the third wave of biocatalysis. *Nature* 484 (7397):185-194
- Bornscheuer UT, Pohl M (2001) Improved biocatalysts by directed evolution and rational protein design. *Current Opinion in Chemical Biology* 5 (2):137-143
- Breuer M, Ditrich K, Habicher T, Hauer B, Keßler M, Stürmer R, Zelinski T (2004) Industrial methods for the production of optically active intermediates. *Angewandte Chemie - International Edition* 43 (7):788-824
- Brzozowski AM, Savage H, Verma CS, Turkenburg JP, Lawson DM, Svendsen A, Patkar S (2000) Structural origins of the interfacial activation in *Thermomyces* (*Humicola*) *lanuginosa* lipase. *Biochemistry* 39 (49):15071-15082

- Busto E, Gotor-Fernandez V, Gotor V (2010) Hydrolases: Catalytically promiscuous enzymes for non-conventional reactions in organic synthesis. *Chemical Society Reviews* 39 (11):4504-4523
- Cabrera Z, Fernandez-Lorente G, Fernandez-Lafuente R, Palomo JM, Guisan JM (2009) Enhancement of Novozym-435 catalytic properties by physical or chemical modification. *Process Biochemistry* 44 (2):226-231
- Cabrera Z, Fernandez-Lorente G, Palomo JM, Guisan JM, Fernandez-Lafuente R (2008) Asymmetric hydrolysis of dimethyl 3-phenylglutarate catalyzed by Lecitase Ultra®. Effect of the immobilization protocol on its catalytic properties. *Enzyme Microb Technol* 43 (7):531-536
- Cabrera Z, Gutarra MLE, Guisan JM, Palomo JM (2010) Highly enantioselective biocatalysts by coating immobilized lipases with polyethyleneimine. *Catalysis Communications* 11 (11):964-967
- Cabrera Z, Palomo JM (2011) Enantioselective desymmetrization of prochiral diesters catalyzed by immobilized *Rhizopus oryzae* lipase. *Tetrahedron Asymmetry* 22 (24):2080-2084
- Cabrera Z, Palomo JM, Fernandez-Lorente G, Fernandez-Lafuente R, Guisan JM (2007) Partial and enantioselective hydrolysis of diethyl phenylmalonate by immobilized preparations of lipase from *Thermomyces lanuginose*. *Enzyme Microb Technol* 40 (5):1280-1285
- Cal PMSD, Vicente JB, Pires E, Coelho AV, Veiros LF, Cordeiro C, Gois PMP (2012) Iminoboronates: A new strategy for reversible protein modification. *J Am Chem Soc* 134 (24):10299-10305
- Cao L, van Langen L, Sheldon RA (2003) Immobilised enzymes: Carrier-bound or carrier-free? *Current Opinion in Biotechnology* 14 (4):387-394
- Carrasco-Lopez C, Godoy C, de Las Rivas B, Fernandez-Lorente G, Palomo JM, Guisan JM, Fernandez-Lafuente R, Martinez-Ripoll M, Hermoso JA (2009) Activation of bacterial thermoalkalophilic lipases is spurred by dramatic structural rearrangements. *J Biol Chem* 284 (7):4365-4372
- Carrico IS (2008) Chemoselective modification of proteins: Hitting the target. *Chemical Society Reviews* 37 (7):1423-1431
- Clark EDB (2001) Protein refolding for industrial processes. *Current Opinion in Biotechnology* 12 (2):202-207
- Cowan DA, Fernandez-Lafuente R (2011) Enhancing the functional properties of thermophilic enzymes by chemical modification and immobilization. *Enzyme Microb Technol* 49 (4):326-346
- Chalker JM, Bernardes GJL, Davis BG (2011) A "tag-and-modify" approach to site-selective protein modification. *Accounts of Chemical Research* 44 (9):730-741
- Chalker JM, Bernardes GJL, Lin YA, Davis BG (2009) Chemical modification of proteins at cysteine: Opportunities in chemistry and biology. *Chemistry - An Asian Journal* 4 (5):630-640
- Dalko PI, Moisan L (2004) In the golden age of organocatalysis. *Angewandte Chemie - International Edition* 43 (39):5138-5175
- Davis BG (2003) Chemical modification of biocatalysts. *Current Opinion in Biotechnology* 14 (4):379-386
- Davis BG (2004) Mimicking Posttranslational Modifications of Proteins. *Science* 303 (5657):480-482
- Dax SL (2009) General Overview. In: *Linker Strategies in Solid-Phase Organic Synthesis*. John Wiley & Sons, Ltd, pp 1-23
- De Graaf AJ, Kooijman M, Hennink WE, Mastrobattista E (2009) Nonnatural amino acids for site-specific protein conjugation. *Bioconjugate Chemistry* 20 (7):1281-1295
- DeSantis G, Jones JB (1999) Chemical modification of enzymes for enhanced functionality. *Current Opinion in Biotechnology* 10 (4):324-330
- Deuss PJ, Denheeten R, Laan W, Kamer PCJ (2011) Bioinspired catalyst design and artificial metalloenzymes. *Chemistry - A European Journal* 17 (17):4680-4698

- Díaz-Rodríguez A, Davis BG (2011) Chemical modification in the creation of novel biocatalysts. *Current Opinion in Chemical Biology* 15 (2):211-219
- Dombkowski AA (2003) Disulfide by Design™: A computational method for the rational design of disulfide bonds in proteins. *Bioinformatics* 19 (14):1852-1853
- Dumas A, Spicer CD, Gao Z, Takehana T, Lin YA, Yasukohchi T, Davis BG (2013) Self-liganded Suzuki-Miyaura coupling for site-selective protein PEGylation. *Angewandte Chemie - International Edition* 52 (14):3916-3921
- Ellman GL (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 82 (1):70-77
- Engström K, Nyhlén J, Sandström AG, Bäckvall JE (2010) Directed evolution of an enantioselective lipase with broad substrate scope for hydrolysis of α -substituted esters. *J Am Chem Soc* 132 (20):7038-7042
- Esté JA, Cihlar T (2010) Current status and challenges of antiretroviral research and therapy. *Antiviral Research* 85 (1):25-33
- Faber K (2011) *Biotransformation in Organic Chemistry*. Springer-Verlag, Berlin
- Fernández-Arrojo L, Guazzaroni ME, López-Cortés N, Belouqui A, Ferrer M (2010) Metagenomic era for biocatalyst identification. *Current Opinion in Biotechnology* 21 (6):725-733
- Fernandez-Lafuente R, Armisen P, Sabuquillo P, Fernandez-Lorente G, Guisan JM (1998) Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. *Chem Phys Lipids* 93 (1-2):185-197
- Fernandez-Lorente G, Godoy CA, Mendes AA, Lopez-Gallego F, Grazu V, de las Rivas B, Palomo JM, Hermoso J, Fernandez-Lafuente R, Guisan JM (2008) Solid-phase chemical amination of a lipase from *Bacillus thermocatenulatus* to improve its stabilization via covalent immobilization on highly activated glyoxyl-agarose. *Biomacromolecules* 9 (9):2553-2561
- Fernandez-Lorente G, Palomo JM, Cabrera Z, Fernandez-Lafuente R, Guisan JM (2007) Improved catalytic properties of immobilized lipases by the presence of very low concentrations of detergents in the reaction medium. *Biotechnology and Bioengineering* 97 (2):242-250
- Fernández-Lorente G, Palomo JM, Cabrera Z, Guisán JM, Fernández-Lafuente R (2007) Specificity enhancement towards hydrophobic substrates by immobilization of lipases by interfacial activation on hydrophobic supports. *Enzyme Microb Technol* 41 (5):565-569
- Ferrero M, Gotor V (2000) Chemoenzymatic transformations in nucleoside chemistry. *Monatshefte für Chemie* 131 (6):585-616
- Filice M, Palomo JM (2012) Monosaccharide derivatives as central scaffolds in the synthesis of glycosylated drugs. *RSC Advances* 2 (5):1729-1742
- Filice M, Romero O, Guisan JM, Palomo JM (2011) trans,trans-2,4-Hexadiene incorporation on enzymes for site-specific immobilization and fluorescent labeling. *Org Biomol Chem* 9 (15):5535-5540
- Foged C, Nielsen HM (2008) Cell-penetrating peptides for drug delivery across membrane barriers. *Expert Opinion on Drug Delivery* 5 (1):105-117
- Foley TL, Burkart MD (2007) Site-specific protein modification: advances and applications. *Current Opinion in Chemical Biology* 11 (1):12-19
- Fuentes M, Maquiese JV, Pessela BC, Abian O, Fernandez-Lafuente R, Mateo C, Guisan JM (2004) New cationic exchanger support for reversible immobilization of proteins. *Biotechnology Progress* 20 (1):284-288
- Galmarini CM, Mackey JR, Dumontet C (2002) Nucleoside analogues and nucleobases in cancer treatment. *Lancet Oncology* 3 (7):415-424
- Gamblin DP, Garnier P, Van Kasteren S, Oldham NJ, Fairbanks AJ, Davis BG (2004) Glyco-SeS: Selenenylsulfide-mediated protein glycoconjugation - A new strategy in post-translational modification. *Angewandte Chemie - International Edition* 43 (7):828-833

- Gamblin DP, Van Kasteren SI, Chalker JM, Davis BG (2008) Chemical approaches to mapping the function of post-translational modifications. *FEBS Journal* 275 (9):1949-1959
- Gao X, Tao W, Lu W, Zhang Q, Zhang Y, Jiang X, Fu S (2006) Lectin-conjugated PEG-PLA nanoparticles: Preparation and brain delivery after intranasal administration. *Biomaterials* 27 (18):3482-3490
- García-Fernández A, Roelfes G (2012) Enantioselective catalysis at the DNA scaffold. *Metal ions in life sciences* 10:249-268
- García-Urdiales E, Alfonso I, Gotor V (2011) Update 1 of: Enantioselective enzymatic desymmetrizations in organic synthesis. *Chemical Reviews* 111 (5):110-180
- Gauthier MA, Klok HA (2010) Polymer-protein conjugates: An enzymatic activity perspective. *Polymer Chemistry* 1 (9):1352-1373
- Godoy CA, de las Rivas B, Filice M, Fernández-Lorente G, Guisan JM, Palomo JM (2010) Enhanced activity of an immobilized lipase promoted by site-directed chemical modification with polymers. *Process Biochemistry* 45 (4):534-541
- Godoy CA, Fernández-Lorente G, De Las Rivas B, Filice M, Guisan JM, Palomo JM (2011a) Medium engineering on modified *Geobacillus thermocatenulatus* lipase to prepare highly active catalysts. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 70 (3-4):144-148
- Godoy CA, Rivas BDL, Grazú V, Montes T, Guisà JM, López-Gallego F (2011b) Glyoxyl-disulfide agarose: A tailor-made support for site-directed rigidification of proteins. *Biomacromolecules* 12 (5):1800-1809
- Gotor-Fernandez V, Brieva R, Gotor V (2006) Lipases: Useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 40 (3-4):111-120
- Gundlach HG, Moore S, Stein WH (1959) The Reaction of Iodoacetate with Methionine. *Journal of Biological Chemistry* 234 (7):1761-1764
- Gutarra MLE, Mateo C, Freire DMG, Torres FAG, Castro AM, Guisan JM, Palomo JM (2011a) Oriented irreversible immobilization of a glycosylated *Candida antarctica* B lipase on heterofunctional organoborane-aldehyde support. *Catalysis Science and Technology* 1 (2):260-266
- Gutarra MLE, Romero O, Abian O, Torres FAG, Freire DMG, Castro AM, Guisan JM, Palomo JM (2011b) Enzyme surface glycosylation in the solid phase: Improved activity and selectivity of *Candida antarctica* lipase B. *ChemCatChem* 3 (12):1902-1910
- Haag R, Kratz F (2006) Polymer therapeutics: Concepts and applications. *Angewandte Chemie - International Edition* 45 (8):1198-1215
- Hackenberger CPR, Schwarzer D (2008) Chemoselective ligation and modification strategies for peptides and proteins. *Angewandte Chemie - International Edition* 47 (52):10030-10074
- Han ZL, Han SY, Zheng SP, Lin Y (2009) Enhancing thermostability of a *Rhizomucor miehei* lipase by engineering a disulfide bond and displaying on the yeast cell surface. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85 (1):117-126
- Hazes B, Dijkstra BW (1988) Model building of disulfide bonds in proteins with known three-dimensional structure. *Protein Engineering, Design and Selection* 2 (2):119-125
- Herdewijn P (2008) Biologically active nucleosides. *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry* (S34):14.10.11-14.10.16
- Hermanson GT (2008) *Bioconjugate Techniques*. 2nd edn. Academic Press, San Diego
- Huang Z, Ye C, Liu Z, Wang X, Chen H, Liu Y, Tang L, Zhao H, Wang J, Feng W, Li X (2012) Solid-phase N-terminus PEGylation of recombinant human fibroblast growth factor 2 on heparin-sepharose column. *Bioconjugate Chemistry* 23 (4):740-750
- Humble MS, Berglund P (2011) Biocatalytic promiscuity. *European Journal of Organic Chemistry* (19):3391-3401

- Jacob C, Giles GI, Giles NM, Sies H (2003) Sulfur and Selenium: The Role of Oxidation State in Protein Structure and Function. *Angewandte Chemie - International Edition* 42 (39):4742-4758
- Jia R, Hu Y, Liu L, Jiang L, Huang H (2013) Chemical modification for improving activity and stability of lipase B from *Candida antarctica* with imidazolium-functional ionic liquids. *Organic and Biomolecular Chemistry* 11 (41):7192-7198
- Joshi NS, Whitaker LR, Francis MB (2004) A three-component Mannich-type reaction for selective tyrosine bioconjugation. *J Am Chem Soc* 126 (49):15942-15943
- Kanaya S, Katsuda C, Kimura S, Nakai T, Kitakuni E, Nakamura H, Katayanagi K, Morikawa K, Ikehara M (1991) Stabilization of *Escherichia coli* ribonuclease H by introduction of an artificial disulfide bond. *Journal of Biological Chemistry* 266 (10):6038-6044
- Kiick KL, Weberskirch R, Tirrell DA (2001) Identification of an expanded set of translationally active methionine analogues in *Escherichia coli*. *FEBS Letters* 502 (1-2):25-30
- Kim PS, Baldwin RL (1990) Intermediates in the folding reactions of small proteins. *Annual Review of Biochemistry* 59:631-660
- Kodadek T, Duroux-Richard I, Bonnafous JC (2005) Techniques: Oxidative cross-linking as an emergent tool for the analysis of receptor-mediated signalling events. *Trends in Pharmacological Sciences* 26 (4):210-217
- Koshland Jr DE, Karkhanis YD, Latham HG (1964) An environmentally-sensitive reagent with selectivity for the tryptophan residue in proteins [13]. *J Am Chem Soc* 86 (7):1448-1450
- Kruithof CA, Casado MA, Guillena G, Egmond MR, Van Der Kerk-van Hoof A, Heck AJR, Gebbink RJMK, Van Koten G (2005) Lipase active-site-directed anchoring of organometallics: Metallopincer/protein hybrids. *Chemistry - A European Journal* 11 (23):6869-6877
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259):680-685
- Le QAT, Joo JC, Yoo YJ, Kim YH (2012) Development of thermostable *Candida antarctica* lipase B through novel in silico design of disulfide bridge. *Biotechnology and Bioengineering* 109 (4):867-876
- Leipold MD, Herrera I, Ornatsky O, Baranov V, Nitz M (2009) ICP-MS-based multiplex profiling of glycoproteins using lectins conjugated to lanthanide-chelating polymers. *Journal of Proteome Research* 8 (2):443-449
- Letondor C, Pordea A, Humbert N, Ivanova A, Mazurek S, Novic M, Ward TR (2006) Artificial transfer hydrogenases based on the biotin-(strept)avidin technology: Fine tuning the selectivity by saturation mutagenesis of the host protein. *J Am Chem Soc* 128 (25):8320-8328
- Li WF, Zhou XX, Lu P (2005) Structural features of thermozymes. *Biotechnology Advances* 23 (4):271-281
- Li X, Higashikubo R, Taylor JS (2008) Use of multiple carboxylates to increase intracellular retention of fluorescent probes following release from cell penetrating fluorogenic conjugates. *Bioconjugate Chemistry* 19 (1):50-56
- Littke AF, Fu GC (2002) Palladium-catalyzed coupling reactions of aryl chlorides. *Angewandte Chemie - International Edition* 41 (22):4176-4211
- Marciello M, Bolivar JM, Filice M, Mateo C, Guisan JM (2013) Preparation of lipase-coated, stabilized, hydrophobic magnetic particles for reversible conjugation of biomacromolecules. *Biomacromolecules* 14 (3):602-607
- Mateo C, Abian O, Bernedo M, Cuenca E, Fuentes M, Fernandez-Lorente G, Palomo JM, Grazu V, Pessela BCC, Giacomini C, Irazoqui G, Villarino A, Ovsejevi K, Batista-Viera F, Fernandez-Lafuente R, Guisán JM (2005) Some special features of glyoxyl supports to immobilize proteins. *Enzyme Microb Technol* 37 (4):456-462

- Mateo C, Palomo JM, Fernandez-Lorente G, Guisan JM, Fernandez-Lafuente R (2007) Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme Microb Technol* 40 (6):1451-1463
- Matsumura M, Matthews BW (1989) Control of enzyme activity by an engineered disulfide bond. *Science* 243 (4892):792-794
- McFarland JM, Francis MB (2005) Reductive alkylation of proteins using iridium catalyzed transfer hydrogenation. *J Am Chem Soc* 127 (39):13490-13491
- Morley KL, Kazlauskas RJ (2005) Improving enzyme properties: When are closer mutations better? *Trends in Biotechnology* 23 (5):231-237
- Muñoz Solano D, Hoyos P, Hernáiz MJ, Alcántara AR, Sánchez-Montero JM (2012) Industrial biotransformations in the synthesis of building blocks leading to enantiopure drugs. *Bioresour Technol* 115:196-207
- Noren CJ, Anthony-Cahill SJ, Griffith MC, Schultz PG (1989) A general method for site-specific incorporation of unnatural amino acids into proteins. *Science* 244 (4901):182-188
- Novikova EV, Tishchenko EV, Iozep AA, Passet BV (2002) Influence of synthesis and isolation conditions on properties of dextran polyaldehyde. *Russian Journal of Applied Chemistry* 75 (6):985-988
- Otten LG, Hollmann F, Arends IWCE (2010) Enzyme engineering for enantioselectivity: from trial-and-error to rational design? *Trends in Biotechnology* 28 (1):46-54
- Palomo JM (2008) Lipases enantioselectivity alteration by immobilization techniques. *Current Bioactive Compounds* 4 (2):126-138
- Palomo JM (2009) Modulation of enzymes selectivity via immobilization. *Current Organic Synthesis* 6 (1):1-14
- Palomo JM (2010) Diels-alder cycloaddition in protein chemistry. *European Journal of Organic Chemistry* (33):6303-6314
- Palomo JM (2013) Click-chemistry in biocatalysis. *Current Organic Chemistry* 17 (7):691-700
- Palomo JM, Cabrera Z (2012) Enzymatic desymmetrization of prochiral molecules. *Current Organic Synthesis* 9 (6):791-805
- Palomo JM, Fernández-Lorente G, Guisán JM, Fernández-Lafuente R (2007) Modulation of immobilized lipase enantioselectivity via chemical amination. *Advanced Synthesis and Catalysis* 349 (7):1119-1127
- Palomo JM, Fernandez-Lorente G, Mateo C, Ortiz C, Fernandez-Lafuente R, Guisan JM (2002a) Modulation of the enantioselectivity of lipases via controlled immobilization and medium engineering: Hydrolytic resolution of mandelic acid esters. *Enzyme Microb Technol* 31 (6):775-783
- Palomo JM, Fernández-Lorente G, Rúa ML, Guisán JM, Fernández-Lafuente R (2003a) Evaluation of the lipase from *Bacillus thermocatulatus* as an enantioselective biocatalyst. *Tetrahedron Asymmetry* 14 (23):3679-3687
- Palomo JM, Fuentes M, Fernandez-Lorente G, Mateo C, Guisan JM, Fernandez-Lafuente R (2003b) General trend of lipase to self-assemble giving bimolecular aggregates greatly modifies the enzyme functionality. *Biomacromolecules* 4 (1):1-6
- Palomo JM, Guisan JM (2012) Different strategies for hyperactivation of lipase biocatalysts. *Methods Mol Biol* 861:329-341
- Palomo JM, Muoz G, Fernández-Lorente G, Mateo C, Fernández-Lafuente R, Guisán JM (2002b) Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-Sepabeads): Immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 19-20:279-286

- Palomo JM, Segura RL, Fernandez-Lorente G, Pernas M, Rua ML, Guisan JM, Fernandez-Lafuente R (2004) Purification, immobilization, and stabilization of a lipase from *Bacillus thermocatenulatus* by interfacial adsorption on hydrophobic supports. *Biotechnol Prog* 20 (2):630-635
- Pàmies O, Bäckvall JE (2004) Chemoenzymatic dynamic kinetic resolution. *Trends in Biotechnology* 22 (3):130-135
- Pérez-Sánchez M, Sandoval M, Hernáiz MJ, de María PD (2013) Biocatalysis in biomass-derived solvents: The quest for fully sustainable chemical processes. *Current Organic Chemistry* 17 (11):1188-1199
- Politz SM, Noller HF, McWhirter PD (1981) Ribonucleic acid-protein cross-linking in *Escherichia coli* ribosomes: (4-Azidophenyl)glyoxal, a novel heterobifunctional reagent. *Biochemistry* 20 (2):372-378
- Polshettiwar V, Molnár A (2007) Silica-supported Pd catalysts for Heck coupling reactions. *Tetrahedron* 63 (30):6949-6976
- Pordea A, Ward TR (2008) Chemogenetic protein engineering: An efficient tool for the optimization of artificial metalloenzymes. *Chemical Communications* (36):4239-4249
- Pordea A, Ward TR (2009) Artificial metalloenzymes: Combining the best features of homogeneous and enzymatic catalysis. *Synlett* (20):3225-3236
- Qi D, Tann CM, Haring D, Distefano MD (2001) Generation of new enzymes via covalent modification of existing proteins. *Chemical Reviews* 101 (10):3081-3111
- Raushel FM (2002) Bacterial detoxification of organophosphate nerve agents. *Current Opinion in Microbiology* 5 (3):288-295
- Reetz MT (2002) Lipases as practical biocatalysts. *Current Opinion in Chemical Biology* 6 (2):145-150
- Reetz MT (2009) Directed evolution of stereoselective hybrid catalysts. vol 25.
- Reetz MT, Wang LW, Bocla M (2006) Directed evolution of enantioselective enzymes: Iterative cycles of CASTing for probing protein-sequence space. *Angewandte Chemie - International Edition* 45 (8):1236-1241
- Roberts MJ, Bentley MD, Harris JM (2002) Chemistry for peptide and protein PEGylation. *Advanced Drug Delivery Reviews* 54 (4):459-476
- Romero O, Filice M, De Las Rivas B, Carrasco-Lopez C, Klett J, Morreale A, Hermoso JA, Guisan JM, Abian O, Palomo JM (2012) Semisynthetic peptide-lipase conjugates for improved biotransformations. *Chemical Communications* 48 (72):9053-9055
- Rosati F, Roelfes G (2010) Artificial Metalloenzymes. *ChemCatChem* 2 (8):916-927
- Sandström AG, Wikmark Y, Engström K, Nyhlén J, Bäckvall JE (2012) Combinatorial reshaping of the *Candida antarctica* lipase A substrate pocket for enantioselectivity using an extremely condensed library. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (1):78-83
- Schlick TL, Ding Z, Kovacs EW, Francis MB (2005) Dual-surface modification of the tobacco mosaic virus. *J Am Chem Soc* 127 (11):3718-3723
- Schmidt-Dannert C, Rua ML, Atomi H, Schmid RD (1996) Thermoalkalophilic lipase of *Bacillus thermocatenulatus*. I. Molecular cloning, nucleotide sequence, purification and some properties. *Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism* 1301 (1-2):105-114
- Sheldon RA, Van Pelt S (2013) Enzyme immobilisation in biocatalysis: Why, what and how. *Chemical Society Reviews* 42 (15):6223-6235
- Sletten EM, Bertozzi CR (2009) Bioorthogonal chemistry: Fishing for selectivity in a sea of functionality. *Angewandte Chemie - International Edition* 48 (38):6974-6998

- Smith MEB, Schumacher FF, Ryan CP, Tedaldi LM, Papaioannou D, Waksman G, Caddick S, Baker JR (2010) Protein modification, bioconjugation, and disulfide bridging using bromomaleimides. *J Am Chem Soc* 132 (6):1960-1965
- Solá RJ, Griebenow K (2006) Influence of modulated structural dynamics on the kinetics of α -chymotrypsin catalysis: Insights through chemical glycosylation, molecular dynamics and domain motion analysis. *FEBS Journal* 273 (23):5303-5319
- Tann CM, Qi D, Distefano MD (2001) Enzyme design by chemical modification of protein scaffolds. *Current Opinion in Chemical Biology* 5 (6):696-704
- Thangudu RR, Vinayagam A, Pugalenthi G, Manonmani A, Offmann B, Sowdhamini R (2005) Native and modeled disulfide bonds in proteins: Knowledge-based approaches toward structure prediction of disulfide-rich polypeptides. *Proteins: Structure, Function and Genetics* 58 (4):866-879
- Tilley SD, Francis MB (2006) Tyrosine-selective protein alkylation using π -allylpalladium complexes. *J Am Chem Soc* 128 (4):1080-1081
- Toda N, Asano S, Barbas CF (2013) Rapid, Stable, Chemoselective Labeling of Thiols with Julia-Kociński-like Reagents: A Serum-Stable Alternative to Maleimide-Based Protein Conjugation. *Angewandte Chemie International Edition* 52 (48):12592-12596
- Toscano MD, Woycechowsky KJ, Hilvert D (2007) Minimalist active-site redesign: Teaching old enzymes new tricks. *Angewandte Chemie - International Edition* 46 (18):3212-3236
- Turner NJ (2009) Directed evolution drives the next generation of biocatalysts. *Nature Chemical Biology* 5 (8):567-573
- Turunen O, Etuaho K, Fenel F, Vehmaanperä J, Wu X, Rouvinen J, Leisola M (2001) A combination of weakly stabilizing mutations with a disulfide bridge in the α -helix region of *Trichoderma reesei* endo-1,4- β -xylanase II increases the thermal stability through synergism. *Journal of Biotechnology* 88 (1):37-46
- Varki A, Cummings DC, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Hart GW, Etzler ME (2009) *Essentials of Glycobiology*. 2nd edn. Cold Spring Harbor Press, New York
- Verger R (1997) 'Interfacial activation' of lipases: Facts and artifacts. *Trends in Biotechnology* 15 (1):32-38
- Walsh CT, Garneau-Tsodikova S, Gatto Jr GJ (2005) Protein posttranslational modifications: The chemistry of proteome diversifications. *Angewandte Chemie - International Edition* 44 (45):7342-7372
- Wells JA, Powers DB (1986) In vivo formation and stability of engineered disulfide bonds in subtilisin. *Journal of Biological Chemistry* 261 (14):6564-6570
- Wender PA, Goun EA, Jones LR, Pillow TH, Rothbard JB, Shinde R, Contag CH (2007) Real-time analysis of uptake and bioactivatable cleavage of luciferin-transporter conjugates in transgenic reporter mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (25):10340-10345
- Wohlgemuth R (2010) Biocatalysis-key to sustainable industrial chemistry. *Current Opinion in Biotechnology* 21 (6):713-724
- Woycechowsky KJ, Raines RT (2000) Native disulfide bond formation in proteins. *Current Opinion in Chemical Biology* 4 (5):533-539
- Wu Q, Soni P, Reetz MT (2013) Laboratory evolution of enantiocomplementary *Candida antarctica* lipase B mutants with broad substrate scope. *J Am Chem Soc* 135 (5):1872-1881
- Yamaguchi S, Takeuchi K, Mase T, Oikawa K, McMullen T, Derewenda U, McElhaney RN, Kay CM, Derewenda ZS (1996) The consequences of engineering an extra disulfide bond in the *Penicillium camembertii* mono- and diglyceride specific lipase. *Protein Engineering* 9 (9):789-795

- Yu K, Sommer W, Richardson JM, Weck M, Jones CW (2005) Evidence that SCS pincer Pd(II) complexes are only precatalysts in Heck catalysis and the implications for catalyst recovery and reuse. *Advanced Synthesis and Catalysis* 347 (1):161-171
- Yu XW, Tan NJ, Xiao R, Xu Y (2012) Engineering a Disulfide Bond in the Lid Hinge Region of *Rhizopus chinensis* Lipase: Increased Thermostability and Altered Acyl Chain Length Specificity. *PLoS ONE* 7 (10)
- Zha D, Wilensek S, Hermes M, Karl Erich J, Reetz MT (2001) Complete reversal of enantioselectivity of an enzyme-catalyzed reaction by directed evolution. *Chemical Communications* (24):2664-2665

Anexos

Romero O, Filice M, De Las Rivas B, Carrasco-Lopez C, Klett J, Morreale A, Hermoso JA, Guisan JM, Abian O, Palomo JM. 2012. *Semisynthetic peptide-lipase conjugates for improved biotransformations*. Chemical Communications 48 (72):9053-9055 <http://dx.doi.org/10.1039/C2CC34816K>

ChemComm

Dynamic Article Link

Cite this: DOI: 10.1039/C2CC34816K

www.rsc.org/chemcomm

COMMUNICATION

Semisynthetic peptide-lipase conjugates for improved biotransformations†

Oscar Romero^a, Marco Filice^a, Blanca de las Rivas^a, Cesar Carrasco-Lopez^a, Javier Klett^a, Antonio Morreale^a, Juan A. Hermoso^a, Jose M. Guisan^a, Olga Abian^a and Jose M. Palomo^{a*}

^aReceived 16 XXX, XXX, 2012; XXXXXXXXXX XXXX; Accepted 18 XXXXXXXXXX 2012
DOI: 10.1039/C2CC34816K

An efficient chemoselective method for the creation of semisynthetic lipases by site-specific incorporation of tailor-made peptides on the lipase lid was developed. These new enzymes showed excellent improved specificity and regioselectivity in different biotransformations.

Chemical modification is a fascinating approach for altering the protein function by the introduction of non-natural fragments into proteins.^{1,2} The development of many diverse strategies for accomplishing site-specific modification of proteins has been a valuable tool for chemistry and biology.³⁻⁷ The addition of covalent residues (such as fluorophores, tags, peptides, bioregional functional groups, etc.) to proteins has also proved useful for a variety of processes and applications both *in vivo* and *in vitro*. Furthermore, this specific modification on proteins have permitted the alteration of catalytic properties of enzymes for creation of novel active or high fidelity, classes, mutants or regiospecific biocatalysts.⁸⁻¹¹ Therefore the combination of molecular biology methods (site-directed mutagenesis, directed evolution, expressed protein ligation, etc.) and efficient synthetic approaches (as peptide synthesis) has made possible to get successfully semisynthetic proteins at high accuracy.

Modification of the nucleophilic site of a specific enzyme is a widely employed strategy for site-selective biocatalysis.¹²⁻¹⁴ A cysteine can be introduced at virtually any position within a protein structure by the chemical mutagenesis and then selectively modified using for example disulfide compounds. Furthermore, the disulfide can be efficiently transformed in a further by a disulfide exchange method.¹⁵

Herein, we describe the design of new semisynthetic lipases by the site-specific incorporation of a set of tailor-made cysteine-containing peptides on successfully engineered thermophilic lipase from *Candida antarctica* thermotolerant (ITL) with a single cysteine in different positions on the lid site of the enzyme (Scheme 1). The chemical modification was performed on the lipase already immobilized on C18-activated Sepharose. This introduces the advantages of solid-state chemistry: among others, the possibility to use an excess of peptide, immediate transformations, or easy purification.¹⁶ The catalytic capacity of the new semisynthetic enzymes on different asymmetric biotransformations was evaluated.

The incorporation of molecules on the oligopeptide lid represents an elegant strategy to control its movement and therefore the lipase catalytic, as far as we know, no example of the improvement of lipase catalytic efficiency by this methodology has been described.

First we focused on the protein engineering of this lipase to replacing the two cysteines (Cys45, Cys296) in the wild type enzyme (ITL wt) by two actives. The new-engineered enzyme (ITL-C45S/C296S) was expressed in *E. coli* without detriment on the enzyme activity.¹⁷ Considering the simplicity of the lipase with a single lid formed by two different loops, the idea was to introduce a unique cysteine in different positions of this engineered enzyme. This approach was first confirmed by a biotransformation study using the asymmetric epoxide isomerization of the enzyme as a model reaction.

These different positions were selected to be mutated: Ab193 (on the internal loop), Leu230 (on the external loop) and Ser285 (on the outside of both loops). These three variations represent a conservative change. The three new variants ITL-C45S/C296S/Ab193C (ITL-A193C), ITL-C45S/C296S/Leu230C (ITL-L230C) and ITL-C45S/C296S/Ser285C (ITL-S285C) were obtained by site-directed mutagenesis with a good production, similar that ITL wt or ITL-C45S/C296S. All ITL variants were efficiently purified by hydrophobic chromatography on butyl-Sepharose supports¹⁸ and characterized kinetic parameters and fluorescence (see ESI†).

For the strategic chemical incorporation of tailor-made peptides including a cysteine on the peptide sequence¹⁹, the protein enzyme was previously protected using 2,2'-dithiodipyrrolidine disulfide (2-PDS) to avoid oxidation (Scheme 1). The different protected ITL variants were specifically modified by disulfide exchange. Considering the acyltransferase reaction on the lid loop two different peptides: Ac-CH₂(CH₂)₄Ph-Cys (P1) and Ac-CH₂(CH₂)₄Ph-Cys (P2) were selected (Fig. S1, ESI†). The ITL-A193C was modified with the complementary p1. ITL-L230C with p1 whereas ITL-S285C was modified with p1 or p2. The coupling reaction in all cases was performed on aqueous solution at pH 7 and 10°C for the complete reactivity (see ESI†). After coupling the disulfide exchange was performed²⁰ to get a kinetically irreversible bond between enzyme and peptide. A quantitative conversion into the corresponding peptide-modified enzyme was observed by mass spectrometry (MALDI-TOF).

Chem Commun, 2012, (46), 9053-9055 | 1

Romero O, Rivero CW, Guisan JM, Palomo JM. *Novel enzyme-polymer conjugates for biotechnological applications*. 2013. PeerJ 1e:27 <http://dx.doi.org/10.7717/peerj.27>

PeerJ

Novel enzyme-polymer conjugates for biotechnological applications

Oscar Romero^a, Cintia W. Rivero^a, Jose M. Guisan and Jose M. Palomo

^aDepartamento de Biotecnología, Instituto de Química (CIC), Udelar

[†]Current address: Laboratorio de Investigación en Biotecnología Tissue Culture, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina

ABSTRACT

In the present research, a rapid, simple and efficient chemoselective method for the site-directed incorporation of tailor-made polymers into proteins to create biocatalysts with excellent properties for pharmaceutical industrial purpose has been performed. First we focused on the protein engineering of the *Candida antarctica* thermotolerant lipase 2 (ITL2) to replace the two cysteines (Cys45, Cys296) in the wild type enzyme (ITL-WT) by two actives. Then, by similar mode, a unique cysteine was introduced in the lid area of the protein. For the site-directed polymer incorporation, a set of different tailor-made thiol-ionic polymers were synthesized and the protein enzyme was previously activated with 2,2'-dithiodipyrrolidine (2-PDS) to allow the disulfide exchange. The protected ITL variants were specifically modified with the different polymers in excellent yields, creating a small library of new biocatalysts. Different and important changes in the catalytic properties, possible caused by structural changes in the lid region, were observed. The different modified biocatalysts were tested in the synthesis of intermediates of antiviral and antitumor drugs, like nucleoside analogues and derivatives of phenylglyoxal acid. In the hydrolysis of *p*-acetylated thymidine, the best biocatalyst was the ITL-L193-DestCOOH, where the activity was increased in 3-fold and the regioselectivity was improved, reaching a yield of 92% of 3'-O-acetyl-thymidine. In the case of the asymmetric hydrolysis of dimethyl phenylglyoxal, the best result was found with ITL-L193-DestNH₂-6000, where the enzyme activity was increased more than 5-fold and the enantiomeric excess was >99%.

Subjects: Biochemistry, Biotechnology, Molecular Biology

Keywords: Mutagenesis, Lipase, Tailor-made polymer, Chemical modification, Biocatalysis, Drug precursors, Biocatalysis, Nucleosides, Protein chemistry

1. INTRODUCTION

Modification of protein with polymers is a widely employed technique for applications in medicine, biotechnology and nanotechnology (Cao et al., 2010; Heng et al., 2000). The incorporation of polymers into proteins improves their stability, solubility and biocompatibility (Fig. 1). Additionally, this kind of modification can also alter the catalytic properties of enzymes for the creation of novel active and selective biocatalysts (Liu et al., 2010; Liu et al., 2012).

Submitted 15 November 2012
Approved 11 January 2013
Published 12 January 2013

Corresponding author
Jose M. Palomo
jpalomo@quimica.unc.edu.ar

Academic editor
Leticia Latorre

Additional Information and
Declarations can be found on
page 15

DOI 10.7717/peerj.27

© Copyright
2013 Romero et al.
Distributed under
Creative Commons CC-BY 3.0

OPEN ACCESS

<http://dx.doi.org/10.7717/peerj.27>

Filice M, Romero O, Guisan JM, Palomo JM. *Trans,trans-2,4-hexadiene incorporation on enzymes for site-specific immobilization and fluorescent labeling.* (2011) Org. Biomol. Chem. 9 5535-5540 <http://dx.doi.org/10.1039/C1OB05401E>

Organic & Biomolecular Chemistry
 Accepted Manuscript
 Chem. Commun., 2011, 9, 5535
 www.rsc.org/obc

Dynamic Article Links
 PAPER

trans,trans-2,4-Hexadiene incorporation on enzymes for site-specific immobilization and fluorescent labeling†

Marc Filice, Oscar Romero, Jose M. Guisan and Jose M. Palomo*

Received 14 March 2011, Accepted 26 April 2011
 DOI: 10.1039/C1OB05401E

Lipase B from *Candida antarctica* (CAL-B) has been site-directly modified by the introduction of a trans,trans-2,4-hexadiene moiety onto lysine residues, identified by MALDI-TOF. This modification on CAL-B permitted its immobilization on 3-aminopropyl-silica support in a more selective manner than square as not immobilized at pH 7 and 25 °C. After the enzyme modification procedure, the catalytic activity of the protein on the solid support was surprisingly increased 3 fold. A trans-esterase mimetic fluorogenic ester was used as a new substrate to study the enzyme in high yield and selective phase under aqueous media. Furthermore, the NBD-labeled CAL-B was also immobilized on the same support, obtaining almost 80% of the specific activity. The preparation of this labeled CAL-B was also possible by a Diels-Alder reaction on solid phase in aqueous media.

Introduction

The selective modification of proteins has been a long-standing challenge of modern chemical biology, with great applications, ranging from the study of nature post-translational modification in the development of protein-based materials, site-specific modifications have been used in the regulation of protein expression and localization, as tools in structure-function studies, in pharmacokinetics of protein-based drugs and to improve biocatalysis, and in the development of biosensors.¹⁻⁴

The incorporation of new functional moieties to proteins has been intensively studied for these last years. Fluorogenic labels, polymers, reactive acids, and peptides, and carbon chains have been coupled to proteins to study or manipulate their function.⁵⁻⁸ These modifications have also permitted the site-specific immobilization of proteins for purification, manipulation or property modulation.⁹⁻¹¹ Importantly, these reactions occur at or near physiological pH and are compatible with the common array of functional groups commonly found in biological macromolecules allowing conjugation reactions to be carried out on supported substrates.

In most of these cases, chemical modification of the amino acids in lysine and tyrosine residues for conjugation reactions because of the reactivity of the thiol and amine residues, respectively.¹²⁻¹⁴ However, cysteines are often found in disulfide bonds that secure stable proteins. Breakage of these bonds can easily lead to loss of structure integrity and, hence, function. Lysine residues are positively charged, predominantly located at the protein surface, and relatively abundant. As a consequence, it is very likely that multiple functional handles are introduced when the residue is targeted for modification.¹⁵ The properties of the holoenzyme thus generated are influenced by the degree and site of modification, therefore it is highly desirable to introduce new functional groups in a more defined manner.¹⁶

One approach to achieve this is on the modification of some protein active sites of which only one reaction is allowed in the solvent. Trans-esterase modification by organosilane compounds¹⁷ or chemical modifications of tryptophan¹⁸ are two examples, actually, different kinds of techniques for protein derivatization, based on synthetic organic chemistry such as repeated protein ligation¹⁹⁻²¹ (Staudinger ligation²² or "click" ligation²³) have been developed to diversify the functional moieties in aqueous media.

However, due to the multifunctionality of biomacromolecules, there is a major and continuing demand for development of new techniques providing alternatives to the methods mentioned above. The required chemistry must be compatible with the functional group found in proteins and proceed chemoselectively under mild conditions and in aqueous solution, preferably in the absence of any previously demanding co-reactant.

The chemical incorporation of a diene group is an interesting modification for the specific introduction of different moieties into proteins such as fluorescent labels, polymers, peptides, by chemoselective cycloaddition reactions such as the Diels-Alder (DA) reaction. The characteristic of the Diels-Alder reaction makes it an ideal methodology for biocatalysis²⁴⁻²⁶ because it is tolerated in aqueous media at very mild reaction conditions (pH 7, room temperature). This reaction has been successfully applied for site-specific modification of antibodies or Fab proteins.²⁷

This chemical strategy could be quite interesting when applied to enzymes, in particular those whose properties can be

† Full journal is at the Royal Society of Chemistry 2011
 Org. Biomol. Chem., 2011, 9, 5535-5540 | 5535

Gutarra MLE, Romero O, Abian O, Torres FAG, Freire DMG, Castro AM, Guisan JM, Palomo JM. 2011. *Enzyme surface glycosylation in the solid phase: Improved activity and selectivity of Candida antarctica lipase B.* CHEMCATCHEM 3 1902-1910 <http://dx.doi.org/10.1002/cctc.201100211>

CHEMCATCHEM
 DOI: 10.1002/cctc.201100211

Enzyme Surface Glycosylation in the Solid Phase: Improved Activity and Selectivity of *Candida Antartica* Lipase B

Melissa L. E. Gutarra,^{a,b} Oscar Romero,^a Olga Abian,^{a,c} Fernando A. G. Torres,^b Denise M. G. Freire,^b Aline M. Castro,^b Jose M. Guisan,^{a,d} and Jose M. Palomo^a*

Sulfolipid oligosaccharides and polymers were investigated for a specific surface glycosylation of *Candida antarctica* lipase (Lipase B, CAL-B) already immobilized on solid supports by chemical activation. The chemical modification was performed in the immobilized active site enzyme media by using low molecular weight oligosaccharides through a reductive amination. Surface directed surface polymerization (SP) using a diene (2,2,6,6-tetramethyl-1,3-pyridine-5-carboxaldehyde (TDAC)) indicated that polymerization conjugates were obtained in all cases. Circular dichroism experiments revealed interesting conformational changes in secondary and tertiary structures of the protein after modification. The formed immobilized glycosylated lipase biocatalysts were more stable, active, and selective toward different substrates than unmodified CAL-B. These immobilized conjugates were compared with a previously glycosylated version of CAL-B supported in silica particles immobilized in the same way. Enzyme thermostability was improved after chemical modification with DMSO-150 and also by the genetic glycosylation, reaching 90-95% activity after 24 h at 55 °C. The catalytic activity of CAL-B was improved by the incorporation of deuterated polymers (D₂-150 or DMSO-150) more than twofold in the hydrolysis of p-nitrophenylacetate and more than twofold in the hydrolysis of methyl mandelate at pH 7. However, the activity of the genetically glycosylated CAL-B was twofold lower in the hydrolysis of both substrates. The enantioselectivity of CAL-B improved for all formed biocatalysts, with the DMSO-150-CAL-B conjugate being the most selective in the hydrolysis of acetyl methyl mandelate (up to 68.1% ee at pH 7). This glycosylated CAL-B also demonstrated the highest enantioselectivity in the transesterification of methyl butyrate with glycerol, with 60% yield of monoacyl ester at 100% conversion compared to 37% yield obtained with unmodified CAL-B or other polymer-lipase conjugates.

Introduction

Chemical modification of proteins is a powerful method for the study and modulation of macromolecular functions.¹⁻³ Traditionally protein glycosylation is the most complex post-translational modification process in humans, more than 50% of proteins are glycosylated, whereas bacteria such as *Escherichia coli* do not have such a glycosylation machinery. Thus, the development of selective covalent strategies to obtain modified proteins that are otherwise difficult to isolate from natural sources is paramount in many ways.⁴ Recently, different chemical strategies, such as transition-metal-catalyzed reactions, cycloaddition reactions, click ligation, or native chemical ligation, focused on their development.⁵⁻¹⁰

The introduction of a sugar tag on a protein represents an interesting advantage in protein chemistry. In addition to improving the functional diversity of proteins and influencing their correct folding, biological activity, tertiary structure stability, or even selective protein purification,¹¹ this modification could be useful for specific protein-protein interactions of high biological interest (e.g., interaction with lectins¹²) for the covalent attachment of multifunctional labels, especially for the detection of multiple parameters of enzyme changes at some positions of an enzyme may alter substrate specificity and stereoselectivity or even switch the enzyme's fundamental catalytic action (Scheme 1).

A glycosylation strategy for proteins has been recently used to improve the stability of peroxidases toward different

© 2011 The Authors. Journal compilation © 2011 The Royal Society of Chemistry
 Published by the Royal Society of Chemistry
 Accepted Manuscript

† Full journal is at the Royal Society of Chemistry 2011
 ChemCatChem, 2011, 3, 1902-1910 | 1902

